

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Butia capitata* UTILIZANDO DIÓXIDO
DE CARBONO SUPERCRÍTICO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DANIEL TOSS

PORTO ALEGRE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Butia capitata* UTILIZANDO DIÓXIDO
DE CARBONO SUPERCRÍTICO

DANIEL TOSS

Dissertação de Mestrado
apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química.

ORIENTADORA:

PROF^ª DR^ª TALITA FURLANETTO MENDES

CO-ORIENTADOR:

PROF. DR. EVANDRO STEFFANI

PORTO ALEGRE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Extração de compostos fenólicos de Butia capitata utilizando dióxido de carbono supercrítico*, elaborada por Daniel Toss, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Cassel

Profª Drª Isabel Cristina Tessaro

Prof. Dr. Marcelo Rossato

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química-PPGEQ da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro, que possibilitou a realização destes estudos.

À Universidade de Caxias do Sul, que permitiu a execução das atividades experimentais, disponibilizando equipamentos e materiais utilizados neste trabalho.

À Prof^a Dr^a. Talita Furlanetto Mendes, pela contribuição intelectual ao trabalho e pela orientação a mim fornecida.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Evandro Steffani, pelo incentivo ao início do mestrado e pelo convite ao trabalho em conjunto.

Aos colegas que iniciaram juntamente o mestrado e estiveram sempre presentes.

Aos meus pais, por acreditarem que a maior conquista do ser humano é a educação.

À Carine, pelo carinho e amor, sempre dando motivos para continuar a viver.

Aos colegas, e principalmente amigos, do LOES que sempre me auxiliaram na execução dos trabalhos.

Enfim, a todos que me auxiliaram nesta caminhada.

Resumo

O presente trabalho investiga a aplicação do processo de extração com fluido supercrítico (EFS) para a obtenção de compostos fenólicos a partir de *Butia capitata*, coletado na Região Sul do Brasil. A planta, chamada popularmente de butiá, é uma espécie nativa da Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil. Os frutos do butiá são comestíveis e bastante apreciados pelas populações locais, que os consomem ao natural ou na forma de licores, geléias ou doces. Estudos recentes revelam que compostos fenólicos estão presentes nos frutos do butiá. Estes compostos merecem atenção por apresentarem atividade antioxidante, por prevenirem doenças cardiovasculares e reduzirem o risco de câncer. Atualmente existem diferentes formas para a obtenção de compostos fenólicos presentes em matrizes vegetais, porém muitas delas utilizam solventes orgânicos a altas temperaturas, o que deprecia o valor comercial dos extratos. Neste estudo, é utilizada uma tecnologia limpa, que tem como solvente o dióxido de carbono (CO₂) em condições supercríticas. O CO₂ é não-tóxico e não-inflamável, o que faz dele uma opção mais segura, quando comparado a outros solventes. Além disso, no estado supercrítico, o CO₂ apresenta condições bastante favoráveis para a extração, como altas difusividades e massas específicas elevadas. Uma característica que deve ser ressaltada é a possibilidade de utilizar baixas temperaturas na extração, comparativamente aos processos que utilizam solventes líquidos, uma vez que os compostos fenólicos são termolábeis. Nos experimentos, foi utilizada apenas a polpa desidratada. O planejamento experimental foi elaborado avaliando a influência de três variáveis de processo em três níveis: pressão (150, 200 e 250 bar), temperatura (40, 50 e 60°C) e teor de cossolvente (1, 3 e 5% de etanol). Os extratos obtidos foram analisados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo os rendimentos expressos em mg do composto identificado por CLAE /100g de polpa de butiá desidratada (PBD), e pelo método Folin-Ciocalteu com os rendimentos em compostos fenólicos totais (CFT) expressos em mg de rutina equivalente (RE)/100g PBD. Foram identificados cinco compostos majoritários nos extratos nas análises em CLAE. As maiores concentrações foram encontradas nas condições de 250 bar, 60°C e 5% de etanol. Os compostos identificados foram o ácido clorogênico (0,46mg/100g PBD), o ácido ferúlico (1,45mg/100g PBD), a rutina (3,47mg/100g PBD), a quercetina (0,90mg/100g PBD) e o canferol (1,93mg/100g PBD). Em termos de CFT, a melhor condição de extração foi de 200 bar, 50°C e 5% de etanol, resultando em 23,09mg RE/100g PBD. Os extratos também foram avaliados quanto ao poder de redução do radical DPPH•, pelo método IC₅₀. O método fornece a quantidade necessária de extrato pra varrer 50% do radical. Como esperado, o extrato obtido na corrida experimental de maior rendimento em CFT apresentou maior atividade antioxidante (17,4 mg/mL), seguido da corrida experimental de maior rendimento em compostos fenólicos isolados (56,1 mg/mL) e, com menos atividade, o extrato obtido por solvente orgânico (80,0 mg/mL).

Palavras-chave: extração com fluido supercrítico, compostos fenólicos, *Butia capitata*, atividade antioxidante

Abstract

In this work it is investigated the application of supercritical fluid extraction to obtain phenolic compounds from *Butia capitata*, collected in southern Brazil. This plant, known popularly as butiá, is a native species in Argentina, Uruguay, Paraguay and Brazil. The edible fruits are popular and eaten raw or as liqueurs, jellies or jams. In recent studies, it is shown that phenolic compounds are present in the fruits of butiá. These compounds deserve attention because they have antioxidant activity, preventing cardiovascular disease and reducing the risk of cancer. There are different processes to obtain phenolic compounds from plant matrices, but many of them make use of organic solvents at high temperatures, which depreciates the extract value. In this study, it is used a clean technology, with carbon dioxide (CO₂) as solvent in supercritical conditions. The CO₂ is nontoxic and nonflammable that makes it a safer option than other solvents. Furthermore, in supercritical conditions the CO₂ has favorable conditions for extraction, as high diffusivities and densities. A feature that should be emphasized is the possibility of using low temperatures in the extract, when compared to processes using liquid solvents, since the phenolic compounds are decomposed by high temperature. In the experiments only the dried pulp was used. The experimental design was developed to assess the influence of three process variables at three levels: pressure (150, 200 e 250 bar), temperature (40, 50 e 60°C) and cosolvent content (1, 3 e 5% of ethanol). The extracts were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), in which the yields were expressed in terms of mg of the identified phenolic compounds by HPLC/100g of dried pulp and by the Folin-Ciocalteu method, with yields, as total phenolic compounds, expressed in mg of rutin equivalent/100g of dried pulp. It were identified five majority phenolic compounds by HPLC. Its highest concentrations were found in the conditions of 250 bar, 60°C and 5% of cosolvent. The identified compounds were chlorogenic acid (0,46mg/100g of dried pulp), ferulic acid (1,45mg/100g of dried pulp), rutin (3,47mg/100g of dried pulp), quercetin (0,90mg/100g of dried pulp) and kaempferol (1,93mg/100g of dried pulp). In terms of total phenolic compounds, the best conditions were 200 bar, 50°C and 5% of cosolvent, which resulted in 23,09mg of rutin equivalent/100g of dried pulp. Also, the antioxidant activity of the extracts was measured by scavenging of the DPPH• radical, by the IC₅₀ method. The method provides the necessary amount of extract to scavenging 50% of the radial. As expected, the extract obtained in experimental run with the highest yield in CFT showed a higher antioxidant activity (17.4 mg / mL), followed by the experimental run with the highest yield in phenolic compounds isolated (56.1 mg / mL), and, with less activity, the extract obtained by organic solvent (80.0 mg / mL).

Keywords: supercritical fluid extraction, phenolic compounds, *Butia capitata*, antioxidant activity

Lista de figuras

FIGURA 1:	SÍNTESE, DE DEGRADAÇÃO E DE INTERCONVERSÃO DAS MOLÉCULAS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO	16
FIGURA 2:	NÚCLEO FUNDAMENTAL DE UM FLAVONÓIDE	18
FIGURA 3:	CANFEROL	19
FIGURA 4:	QUERCETINA	19
FIGURA 5:	RUTINA.....	19
FIGURA 6:	NARINGENINA.....	20
FIGURA 7:	TAXIFOLINA	20
FIGURA 8:	ÁCIDO <i>P</i> -CUMÁRICO	20
FIGURA 9:	ÁCIDO CAFÉICO	20
FIGURA 10:	ÁCIDO SINÁPICO.....	20
FIGURA 11:	ÁCIDO FERÚLICO	20
FIGURA 12:	ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	21
FIGURA 13:	ÁRVORES DO GÊNERO <i>BUTIA</i>	25
FIGURA 14:	DIAGRAMA DE FASES PARA O CO ₂	28
FIGURA 15:	ESQUEMA DO PROCESSO DE ESF	31
FIGURA 16:	FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EFS	41
FIGURA 17:	BOMBA DE DIAFRAGMA.....	46
FIGURA 18:	ACUMULADOR	47
FIGURA 19:	CURVA DE VAZÃO DE CO ₂ A 150, 200 E 250 BAR.....	50
FIGURA 20:	CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DE AMOSTRAS DE DIFERENTES EXTRATOS E PADRÕES.....	53
FIGURA 21:	CROMATOGRAMA GERADO POR CLAE DA AMOSTRA DO EXTRATO SUPERCRÍTICO	55
FIGURA 22:	LOCALIZAÇÃO DO BUTIAZAL EM BARRA DO RIBEIRO/RS.....	56
FIGURA 23:	EXEMPLARES DE <i>BUTIA CAPITATA</i> EM BARRA DO RIBEIRO/RS	57
FIGURA 24:	CACHO DE FRUTOS DO BUTIÁ.....	58
FIGURA 25:	SECADOR COM CIRCULAÇÃO FORÇADA DE AR UTILIZADO NA DESIDRATAÇÃO DA POLPA DE BUTIÁ	58
FIGURA 26:	EQUIPAMENTO DE SOXHLET	60
FIGURA 27:	EQUIPAMENTO DE EFS	61
FIGURA 28:	CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA OS DIFERENTES COMPOSTOS	67
FIGURA 29:	COMPORTAMENTO DOS RENDIMENTOS EM ÁCIDO CLOROGÊNICO COMO FUNÇÃO DA TEMPERATURA, NAS DIFERENTES PRESSÕES E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COSSOLVENTE	69

FIGURA 30: COMPORTAMENTO DOS RENDIMENTOS EM ÁCIDO FERÚLICO COMO FUNÇÃO DA TEMPERATURA, NAS DIFERENTES PRESSÕES E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COSSOLVENTE	71
FIGURA 31: COMPORTAMENTO DOS RENDIMENTOS EM RUTINA COMO FUNÇÃO DA TEMPERATURA, NAS DIFERENTES PRESSÕES E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COSSOLVENTE	73
FIGURA 32: COMPORTAMENTO DOS RENDIMENTOS EM QUERCETINA COMO FUNÇÃO DA TEMPERATURA, NAS DIFERENTES PRESSÕES E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COSSOLVENTE	75
FIGURA 33: COMPORTAMENTO DOS RENDIMENTOS EM CANFEROL COMO FUNÇÃO DA TEMPERATURA, NAS DIFERENTES PRESSÕES E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COSSOLVENTE	77
FIGURA 34: COMPORTAMENTO DOS RENDIMENTOS EM CFT COMO FUNÇÃO DA TEMPERATURA, NAS DIFERENTES PRESSÕES E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COSSOLVENTE	79
FIGURA 35: TESTE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	82

Lista de tabelas

TABELA 1:	CLASSIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	18
TABELA 2:	TEMPERATURA E PRESSÃO CRÍTICAS DE ALGUMAS SUBSTÂNCIAS	26
TABELA 3:	PRESSÃO (EM BAR) PARA CADA PAR MASSA ESPECÍFICA E TEMPERATURA DO CO ₂	29
TABELA 4:	COMPARAÇÃO ENTRE ALGUNS PARÂMETROS DOS DIFERENTES ESTADOS FÍSICOS DAS SUBSTÂNCIAS	29
TABELA 5:	APLICAÇÕES DE EFS	36
TABELA 6:	VAZÃO MÁSSICA DE CO ₂ A DIFERENTES CONDIÇÕES DE BOMBEAMENTO	49
TABELA 7:	COMPOSTOS PADRÕES UTILIZADOS NAS ANÁLISES	54
TABELA 8:	VARIÁVEIS E RESPECTIVOS NÍVEIS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS	61
TABELA 9:	QUANTIDADES DE COSSOLVENTE ADICIONADAS NAS EXTRAÇÕES	62
TABELA 10:	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A EFS	63
TABELA 11:	GRADIENTE DA FASE MÓVEL	64
TABELA 12:	RENDIMENTOS EM ÁCIDO CLOROGÊNICO	68
TABELA 13:	ANOVA PARA OS RENDIMENTOS EM ÁCIDO CLOROGÊNICO	69
TABELA 14:	RENDIMENTOS EM ÁCIDO FERÚLICO	70
TABELA 15:	ANOVA PARA OS RENDIMENTOS EM ÁCIDO FERÚLICO	71
TABELA 16:	RENDIMENTOS EM RUTINA OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS	72
TABELA 17:	ANOVA PARA OS RENDIMENTOS EM RUTINA	73
TABELA 18:	RENDIMENTOS EM QUERCETINA OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS	74
TABELA 19:	ANOVA PARA OS RENDIMENTOS EM QUERCETINA	75
TABELA 20:	RENDIMENTOS EM CANFEROL OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS	76
TABELA 21:	ANOVA PARA OS RENDIMENTOS EM CANFEROL	77
TABELA 22:	RENDIMENTOS EM CFT OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS	78
TABELA 23:	ANOVA PARA OS RENDIMENTOS EM CFT	79
TABELA 24:	VALORES DE IC ₅₀	81

Sumário

INTRODUÇÃO	12
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 Compostos fenólicos	17
1.1.1 <i>Classificação</i>	17
1.1.2 <i>Flavonóides</i>	17
1.1.3 <i>Ácidos cinâmicos</i>	20
1.1.4 <i>Aplicações dos compostos fenólicos</i>	21
1.1.4.1 <i>Ácido clorogênico</i>	21
1.1.4.2 <i>Ácido ferúlico</i>	22
1.1.4.3 <i>Rutina</i>	22
1.1.4.4 <i>Quercetina</i>	23
1.1.4.5 <i>Canferol</i>	23
1.2 Butiá.....	24
1.2.1 <i>Presença de compostos fenólicos no butiá</i>	25
1.3 Fluidos supercríticos.....	26
1.3.1 <i>Propriedades dos fluidos supercríticos</i>	26
1.3.1.1 <i>Fluidos supercríticos modificados</i>	30
1.4 Extração com fluido supercrítico (EFS).....	30
1.4.1 <i>Bombas para o solvente</i>	31
1.4.2 <i>Vaso de extração</i>	32
1.4.3 <i>Adição de cossolvente</i>	32
1.4.4 <i>Leito de extração</i>	33
1.4.5 <i>Restritor</i>	34
1.4.6 <i>Coleta dos extratos</i>	34
1.4.7 <i>Aplicações da ESF</i>	35
2 PRÉ-OPERAÇÃO DO EQUIPAMENTO PILOTO DE ESF	41
2.1 <i>Teste hidrostático</i>	48
2.2 <i>Calibração do acumulador</i>	48
2.3 <i>Curva de vazão da bomba</i>	48
2.3.1 <i>Dióxido de carbono</i>	48
2.3.2 <i>Cossolvente</i>	50
3 ATIVIDADES PRELIMINARES	51
3.1 <i>Análise qualitativa dos extratos de butiá</i>	52
3.1.1 <i>Cromatografia de camada delgada</i>	52
3.1.2 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1 <i>Coleta e preparação do material vegetal</i>	56
4.1.1 <i>Coleta</i>	57
4.1.2 <i>Preparação das amostras</i>	58
4.1.3 <i>Determinação do teor de umidade</i>	59
4.2 <i>Extração</i>	59
4.2.1 <i>Extração em soxhlet</i>	59
4.2.2 <i>Extração em equipamento supercrítico</i>	60
4.3 <i>Procedimentos analíticos</i>	62
4.3.1 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	63
4.3.1.1 <i>Compostos fenólicos totais</i>	64
4.3.2 <i>Teste estatístico</i>	64
4.3.3 <i>Determinação da atividade antioxidante</i>	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66

5.1	Preparação das amostras	66
5.2	Análise quantitativa	66
5.2.1	Ácido clorogênico	68
5.2.2	Ácido ferúlico.....	69
5.2.3	Rutina.....	71
5.2.4	Quercetina.....	73
5.2.5	Canferol.....	75
5.2.6	Compostos fenólicos totais (CFT)	77
5.2.7	Efeito do teor do cossolvente.....	80
5.2.8	Efeito da temperatura e da pressão.....	81
5.3	Atividade antioxidante	81
6	CONCLUSÕES.....	83
7	SUGESTÕES FUTURAS	85
8	REFERÊNCIAS.....	86

Introdução

Há muito tempo se reconhecem os vegetais como parte integrante e fonte de vitaminas, proteínas, carboidratos e sais minerais na alimentação humana. Do ponto de vista medicinal, suas primeiras atividades foram baseadas no poder de cura das plantas e, até hoje, se utilizam os vegetais com esta finalidade. Estas propriedades são investigadas cientificamente com a finalidade de atribuir a cada composto, a respectiva ação de cura. Os estudos com plantas abriram um campo amplo no ramo farmacêutico e alimentar. A possibilidade de se isolar algum composto vegetal permitiu o desenvolvimento de produtos naturais, como suplementos alimentares e até mesmo alimentos ricos em compostos benéficos ao homem. Podem-se citar, também, os compostos naturais capazes de conservar alimentos, com propriedades antioxidantes. A utilização destes compostos permite produzir alimentos com maior segurança, quando comparada à utilização de produtos sintéticos.

Seguindo o mesmo caminho, encontram-se as técnicas de extração chamadas de “química verde”, aplicadas aos produtos naturais. Destacam-se, neste segmento, os processos que não geram poluentes químicos e nem degradam os compostos de interesse. Processos de extração por micro-ondas, por ultrassom ou que fazem uso de fluidos no estado supercrítico se encontram neste grupo.

A espécie *Butia capitata*, conhecida como butiá, é uma planta nativa no Rio Grande do Sul. Muito poucos são os estudos do seu potencial econômico, fazendo com que as áreas onde é encontrada sejam devastadas. A única exploração econômica se limita ao consumo dos frutos, tanto ao natural como em forma de geléias e licores. Assim, outras finalidades podem ser atribuídas à planta. Neste trabalho, é apresentada uma investigação sobre os compostos fenólicos presentes na polpa dos frutos de butiá,

com uma possível aplicação na indústria farmacêutica e de alimentos. Desta forma, poder-se-ia desenvolver a preservação econômica e sustentável desse recurso nativo.

A primeira observação de uma fase supercrítica ocorreu em 1822, pelo Barão Cagniard de La Tour. Ele notou, visualmente, que a separação de fases entre um gás e um líquido desaparecia quando certas substâncias eram aquecidas em recipientes fechados. O que inicialmente foi apenas um fato curioso, hoje em dia atingiu uma esfera científica e industrial, sendo aplicado em diversos estudos e processos. Os primeiros trabalhos que demonstraram o poder de solvência dos fluidos supercríticos são do ano de 1879, reportados por Hannay e Hogarth. Estes autores estudaram a solubilidade do cloreto de cobalto, cloreto de ferro, brometo de potássio e iodeto de potássio em etanol supercrítico.

A escolha do dióxido de carbono, como solvente de extração, torna o processo totalmente amigável ao meio ambiente, pois este solvente é não-tóxico, não-inflamável, não gera poluição, e, em seu estado supercrítico, apresenta boas propriedades de extração, como baixa viscosidade (comparado aos gases), elevada massa específica (comparado aos líquidos) e alta difusividade (mais próxima a dos gases).

Este trabalho apresenta a aplicação do processo de extração com fluido supercrítico (EFS) para a obtenção de compostos fenólicos da polpa de butiá. Dentre os principais objetivos, cita-se a determinação das melhores condições que permitam maximizar os rendimentos em compostos fenólicos, tais como pressão e temperatura do dióxido de carbono, bem como o teor de cossolvente (etanol) adicionado como modificador de polaridade. Também é feita uma comparação dos rendimentos obtidos na ESF com os de um processo de extração com solvente orgânico. Por fim, os extratos, obtidos por solvente supercrítico e por solvente orgânico, foram comparados quando ao poder de varredura do radical DPPH•.

Nos capítulos seguintes será abordada uma revisão de literatura sobre os compostos fenólicos, relatando a presença e função nas plantas, bem como a aplicação destes compostos. Será, também, apresentada uma revisão do processo de ESF e o emprego desta técnica para a obtenção dos compostos fenólicos. Em um capítulo específico serão descritas as atividades iniciais efetuadas no equipamento piloto de ESF, existente na Universidade de Caxias do Sul, apresentando os

procedimentos pré-operacionais e a definição dos procedimentos de extração. Nos capítulos que seguem serão apresentadas a metodologia aplicada e os resultados obtidos no trabalho. Por fim, descrevem-se as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

1 Revisão bibliográfica

Produtos naturais têm sua origem em plantas e são produzidos pelo metabolismo vegetal, classificado como primário e secundário. O metabolismo primário é responsável pela produção de substâncias indispensáveis à planta, as quais se formam graças ao processo fotossintético (CRUZ, NOZAKI e BATISTA, 2000). Já no metabolismo secundário são produzidos compostos não-essenciais à planta (VERPOORTE, 2000).

O metabolismo secundário é caracterizado pela sua grande diversidade química, porém é peculiar para cada organismo, podendo, também, interagir com os demais organismos do ambiente. Durante muitos anos, os metabólitos secundários foram considerados como substâncias sem utilidade aparente para as plantas, mas, atualmente, é aceito que estejam envolvidos nas relações da planta com o ecossistema, agindo na defesa contra doenças ou na atração de polinizadores (VERPOORTE, 2000).

As rotas metabólicas de síntese, de degradação e de interconversão das moléculas do metabolismo secundário podem ser vistas na Figura 1. Essa rota ocorre, geralmente, durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse causados por limitações nutricionais ou ataque microbiológico. A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Alguns metabólitos secundários derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados

deste, como é o caso das antraquinonas, dos flavonóides e dos taninos condensados (SANTOS, 2001).

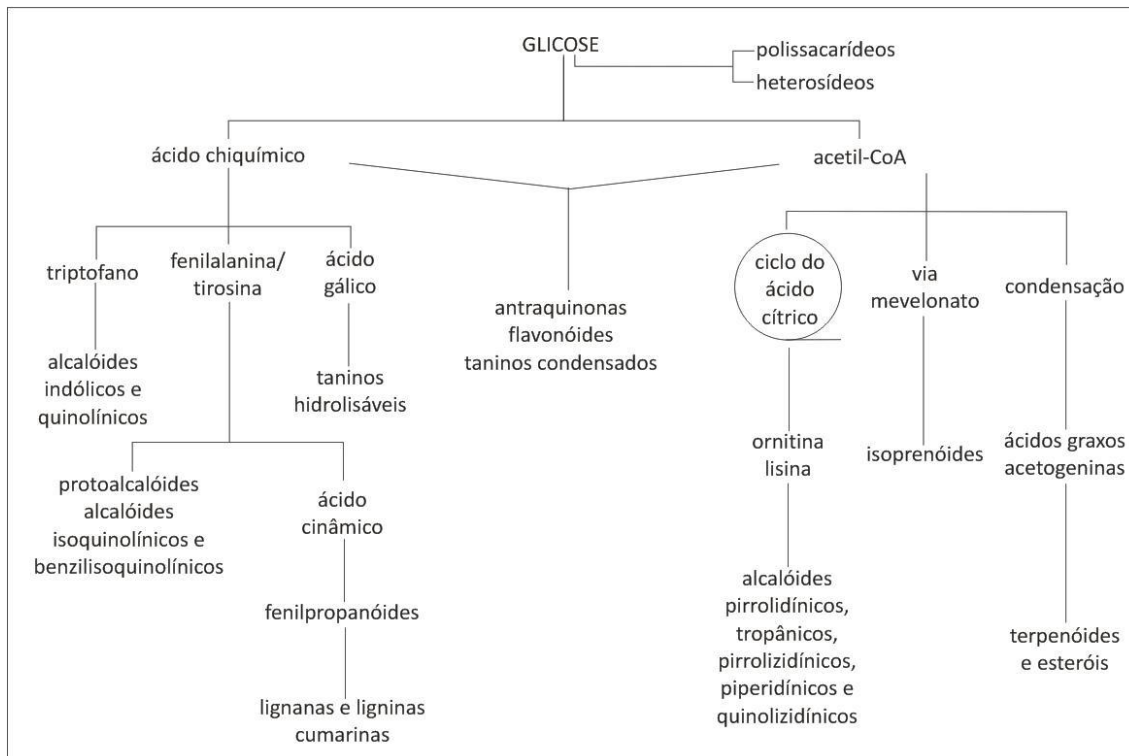


FIGURA 1: Síntese, de degradação e de interconversão das moléculas do metabolismo secundário

FONTE: (SANTOS, 2001)

Os metabólitos secundários podem ser classificados com base nas suas características químicas, na origem da planta ou, ainda, na rota biossintética. Do ponto de vista químico, os compostos podem ser divididos em grupos com base em características típicas, tais como alcalóides, caracterizados por uma base nitrogenada, ou fenólicos que são caracterizados por anéis aromáticos com um grupo hidroxila fenólica. Outros grupos ou subgrupos são baseados no tipo de esqueleto base, como por exemplo, o antraceno, cumarina, quinona, indole, isiquinolina, entre outros (VERPOORTE, 2000).

Do ponto de vista econômico, os metabólitos secundários representam importante valor, por fazerem parte da produção de medicamentos, fragrâncias, sabores, corantes e inseticidas. O elevado potencial econômico proporcionado pela biodiversidade natural faz aumentar a busca por novos medicamentos. Com isso, a maior parte dos medicamentos encontrados atualmente é de origem natural ou

derivados destes. Há muitos anos, a humanidade tem o hábito de tratar de doenças utilizando plantas medicinais, embora esta técnica não esteja baseada em fundamentos científicos, acredita-se que o princípio ativo dessas plantas encontra-se no metabolismo secundário (VERPOORTE, 2000).

1.1 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que possuem, pelo menos, um anel aromático no qual um ou mais hidrogênios são substituídos por um agrupamento hidroxila. Os vegetais, e grande parte dos microorganismos, têm a capacidade de sintetizar o anel benzênico e, a partir dele, compostos fenólicos. Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais são encontradas estruturas tão variadas quanto às dos ácidos fenólicos, dos derivados da cumarina, dos pigmentos hidrossolúveis das flores, dos frutos e das folhas. Além disso, essa classe de compostos abrange as ligninas e os taninos, polímeros com importantes funções nos vegetais. Ainda, estruturas fenólicas são encontradas fazendo parte de proteínas, alcalóides e terpenóides (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2001).

1.1.1 Classificação

Os compostos fenólicos podem ser classificados segundo o tipo de esqueleto principal, conforme representado na Tabela 1, onde C₆ corresponde ao anel benzênico.

1.1.2 Flavonóides

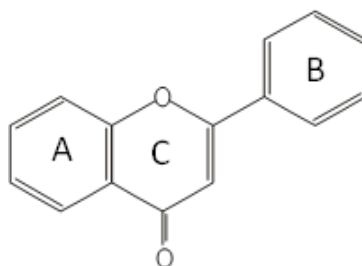
Flavonóides são compostos C₁₅ e todos têm a estrutura C₆-C₃-C₆ (Figura 2) e podem ser agrupados em três grandes categorias, com base na sua estrutura geral. Em cada caso, dois anéis benzênicos são ligados entre si por um grupo de três carbonos. É a disposição do grupo C₃, que determina a forma como os compostos são classificados (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

TABELA 1: Classificação dos compostos fenólicos

Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6 – C1	Ácidos fenólicos
C6 – C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6 – C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6 – C4	Naftoquinonas
C6 – C1 – C6	Xantonas
C6 – C2 – C6	Etilbenzenos, antraquinonas
C6 – C3 – C6	Flavonóides e isoflavonóides
(C6 – C3) ₂	Ligninas
(C6 – C3 – C6) ₂	Diflavonóides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6 – C3) _n	Ligninas
(C6 – C1) _n	Taninos hidrolisáveis
(C6 – C3 – C6) _n	Taninos condensados

Fonte: CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL (2001)

O termo fenólico ou polifenol pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais como os ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros (ZUANAZZI, 2001).

**FIGURA 2: Núcleo fundamental de um flavonóide**

Os flavonóides apresentam importante função no crescimento e desenvolvimento das plantas. Muitas dessas tarefas são fundamentais para a sobrevivência, como a atração de vetores animais para polinização e dispersão de sementes, a estimulação de bactérias do tipo *Rhizobium* para fixação de nitrogênio, a promoção do crescimento do tubo polínico e a reabsorção dos nutrientes minerais das folhas velhas. Outra função é fornecer uma vantagem competitiva para o crescimento da planta, flavonóides são conhecidos por melhorar a tolerância a uma variedade de

estressores abióticos, são empregados como agentes de defesa contra herbívoros e patógenos, além de ser a base para a interação alelopática (capacidade das plantas produzirem substâncias químicas que, liberadas no ambiente de outras, influenciam de forma favorável ou desfavorável o seu desenvolvimento) com outras espécies vegetais (GOULD e LISTER, 2006).

Os flavonóides de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Esta forma, chamada conjugada, também é conhecida como heterosídeo. Quando o metabólito (flavonóide, antraquinona, terpenos, entre outros) encontra-se sem o açúcar, é chamado deaglicona ou genina, sendo comumente denominada de forma livre (ZUANAZZI, 2001). Alguns exemplos de flavonóides podem ser vistos nas Figuras 3 a 7.

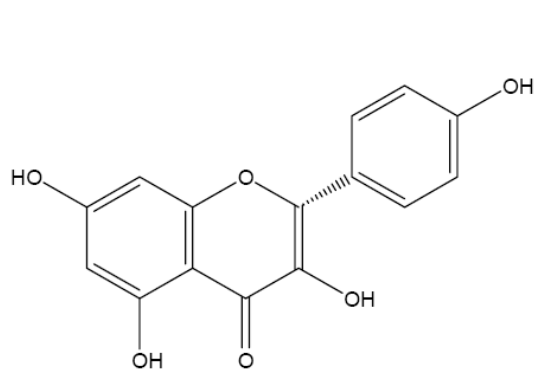


FIGURA 3: Canferol

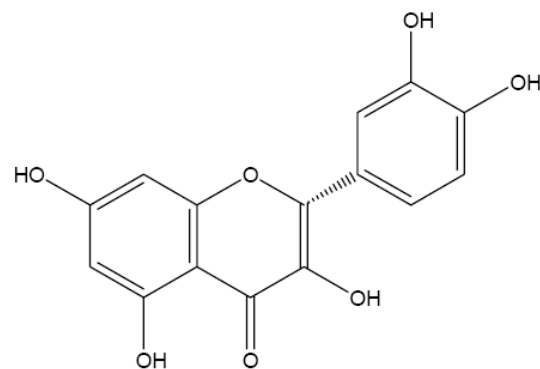


FIGURA 4: Quercetina

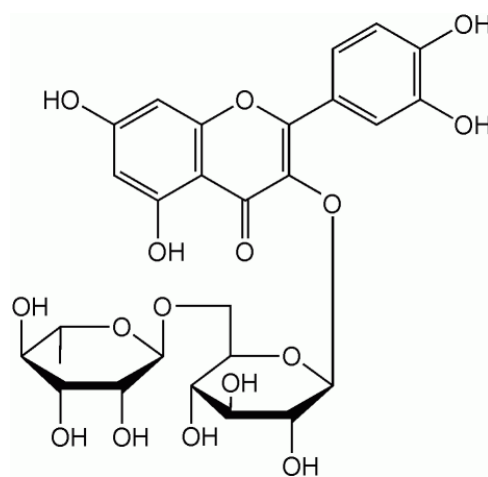


FIGURA 5: Rutina

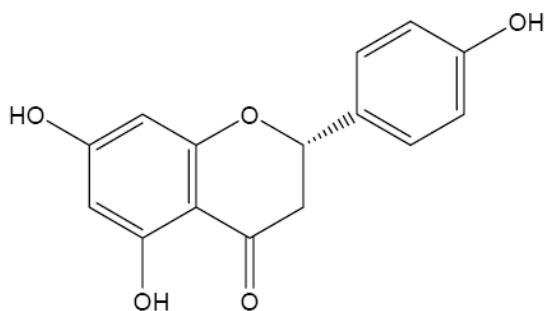


FIGURA 6: Naringenina

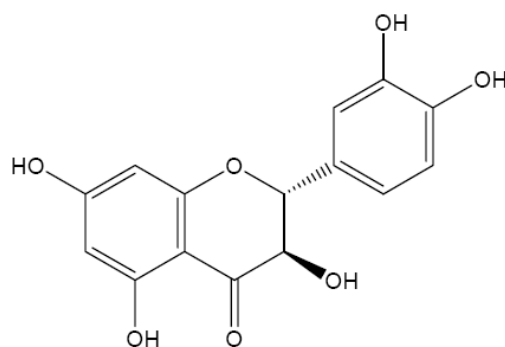


FIGURA 7: Taxifolina

1.1.3 Ácidos cinâmicos

Segundo Carvalho, Gosmann e Shenkel (2001), praticamente todos os vegetais apresentam pelo menos um ácido cinâmico, dentre eles o ácido *p*-cumárico (Figura 8), o ácido caféico (Figura 9), o ácido sinápico (Figura 10) e o ácido ferúlico (Figura 11).

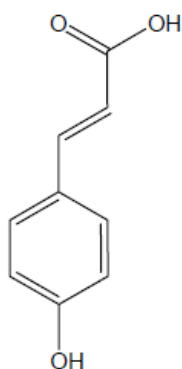
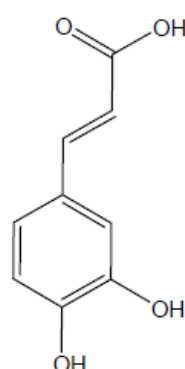
FIGURA 8: Ácido *p*-cumárico

FIGURA 9: Ácido caféico

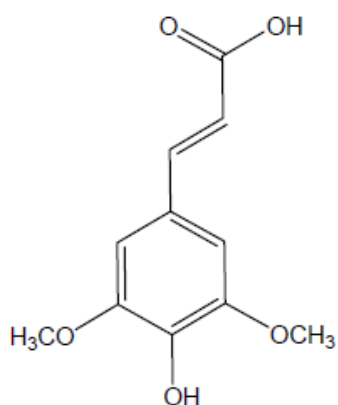


FIGURA 10: Ácido sinápico

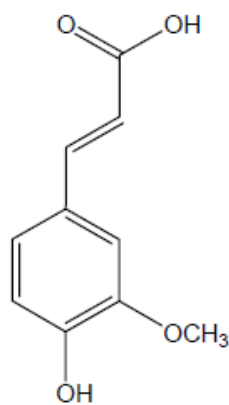


FIGURA 11: Ácido ferúlico

O primeiro composto a ser identificado, na classe dos ácidos cinâmicos, foi o ácido clorogênico (Figura 12), encontrado por Payen em 1846 nos grãos de café (CARVALHO, GOSMANN e SHENKEL 2001). Nas plantas, o ácido clorogênico apresenta baixa toxicidade, mas pode atuar contra patógenos fracos (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

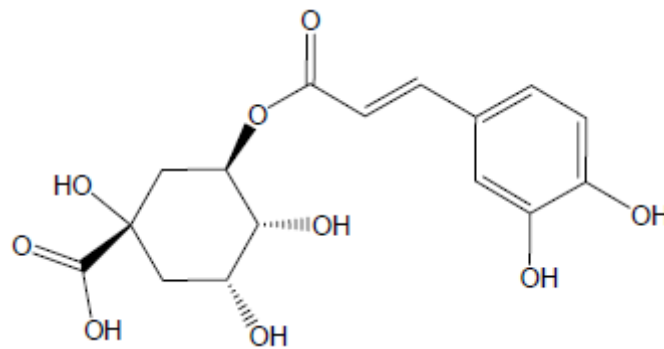


FIGURA 12: Ácido clorogênico

1.1.4 Aplicações dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, por estarem presentes nos vegetais, fazem parte da alimentação humana. Observa-se importante papel destes compostos sobre o organismo, na prevenção de doenças cardiovasculares e de câncer, propriedades antioxidantes e ação contra toxinas (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006). Isoflavonóides atuam principalmente na prevenção do câncer de próstata, de colo do útero e de mama. Por apresentarem atividades antioxidantes, os isoflavonóides também auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares. O consumo destes fenólicos juntamente com cálcio previne a osteoporose (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

1.1.4.1 Ácido clorogênico

Fórmula química: $C_{16}H_{18}O_9$

Fórmula estrutural: Figura 12

Massa molar: 354,3 g/mol

Esse ácido foi isolado em 1907, na forma de um complexo cristalino, denominado clorogenato de cafeína, a partir do qual se preparou um ácido puro. O

ácido clorogênico é encontrado em uma gama de alimentos de origem vegetal. O café é uma das principais fontes do ácido na dieta humana. Uma amplitude de funções nas plantas tem sido relacionada à presença de ácido clorogênico como, por exemplo, a adstringência e a inibição das atividades enzimáticas relacionadas ao fim do estágio de dormência e ao início do processo de desenvolvimento da planta (DE MARIA e MOREIRA, 2004).

A partir da década de 80, os efeitos protetores e deletérios do ácido clorogênico, sobre células de espécies do reino animal, foram abordados em diferentes trabalhos, mostrando que o ácido é um agente indutor de alterações no DNA de mamíferos e apresenta efeito antioxidante na redução da hemólise e da peroxidação de hemácias (OHNISHI et al., 1994).

1.1.4.2 *Ácido ferúlico*

Fórmula química: $C_{10}H_{10}O_4$

Fórmula estrutural: Figura 11

Massa molar: 194,18 g/mol

As propriedades do ácido ferúlico são semelhantes ao ácido clorogênico, porém apresenta maior atividade antioxidante (SOARES, 2002). O ácido ferúlico é um dos ingredientes de muitos alimentos bioativos. Ele é encontrado em alimentos como, por exemplo, o farelo de trigo, cereais integrais, frutas cítricas, banana, café, beterraba, repolho, espinafre e brócolis (ZHAO e MOGHADASIAN, 2008).

1.1.4.3 *Rutina*

Fórmula química: $C_{27}H_{30}O_{16}$

Fórmula estrutural: Figura 5

Massa molar: 610,51 g/mol

A rutina é sintetizada pelas plantas como uma forma de proteção contra a radiação ultravioleta e algumas doenças (ROZEMA et al., 2002). A parte fenólica da molécula é ligada com um açúcar (parte hidrofílica da molécula). Isso faz com que o efeito biológico da rutina seja reduzido, porém a solubilidade é aumentada. A rutina é

um metabólito secundário das plantas que se antagoniza à fragilidade capilar, reduz a pressão arterial, reduz a permeabilidade dos vasos sanguíneos, tem um efeito anti-edema e reduz o risco de arteriosclerose (KREFT, FABJAN e YASUMOTO, 2006).

1.1.4.4 Quercetina

Fórmula química: $C_{15}H_{10}O_7$

Fórmula estrutural: Figura 4

Massa molar: 302,23 g/mol

A quercetina apresenta, da mesma forma que a rutina, proteção contra a radiação ultravioleta nas plantas. Ela está presente em alimentos, incluindo vegetais, frutas, chá e vinho tinto. Diversas propriedades biológicas da quercetina foram relatadas como benéficas para a saúde humana, incluindo a proteção contra várias doenças, como osteoporose, certos tipos de câncer pulmonar, doenças cardiovasculares e envelhecimento precoce.

1.1.4.5 Canferol

Fórmula química: $C_{15}H_{10}O_6$

Fórmula estrutural: Figura 3

Massa molar: 286,23 g/mol

O canferol é um composto fenólico bastante encontrado na dieta humana. Pode ser encontrado em chás, nos brócolis, na toranja, entre outras fontes vegetais. É atribuído ao canferol o papel de prevenção dos efeitos pós-menopausa, proteção contra doenças cardiovasculares e osteoporose. Além disto, o canferol pode auxiliar no combate ao câncer de próstata e pulmão, pela inibição da degradação do núcleo de DNA (WANG et al., 2009). Uma fonte rica em canferol é o *Ginkgo biloba* que pode auxiliar no combate ao Mal-de-Alzheimer (LEUNG et al., 2007).

1.2 Butiá

O gênero *Butia* (Figura 13) apresenta diferentes espécies e subespécies, tais como *B. archeri*, *B. capitata*, *B. odorata*, *B. eriospata*, *B. microspadix*, *B. paraguayensis*, *B. purpurascens*, *B. lallemantii* e *B. yatay*. No Brasil, ocorrem em Minas Gerais, Bahia, Paraná, Goiás, Mato Grosso, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; podem ocorrer, também no Uruguai, Argentina e Paraguai (HENDERSON, GALEANO e BERNAL, 1995; LORENZI et al., 2004).

A maioria das espécies apresenta troncos simples, espessos, de até 10 m de altura e de 30 a 45 cm de diâmetro, com cicatrizes dos restos de pecíolos. Suas folhas são arqueadas e de coloração verde cinzenta, tendo 1 a 2 m de comprimento, sendo sustentadas por pecíolo de 0,60 a 0,75 cm de comprimento, geralmente espinhoso e pina com até 55 pares, distribuídas regularmente ao longo da raque. A inflorescência é ramificada com até 150 ramos distribuídos ao longo de um cacho de até 1 m. Os frutos são globulosos de polpa amarelo-alaranjado de sabor agridoce. Os caroços são, da mesma forma, globulares com 1 a 3 compartimentos onde se encontram as sementes (REITZ, 1974, LORENZI et al., 1996; LORENZI, 2004).

A madeira do butiá pode ser utilizada em construções rústicas. Os frutos são comestíveis e muito apreciados pelas populações locais, que os consomem ao natural ou na forma de licores ou geléias. A amêndoa é comestível e fornece óleo alimentar. As folhas são utilizadas para a fabricação de chapéus, cestos, cordas e para o enchimento de colchões e estofados. Os frutos são também consumidos por diferentes espécies de pássaros. A árvore é extremamente ornamental e utilizada para paisagismo (LORENZI, 2004).

Pela ação do homem no transporte de sementes, ou pela facilidade de hibridação das mesmas, é encontrada uma grande variedade de caracteres morfológicos neste gênero. Em vista desta dificuldade, os estudos morfológicos e fitoquímicos podem auxiliar na identificação das espécies deste gênero (ROSSATO, 2007).



FIGURA 13: Árvores do gênero *Butia*

Foto: Daniel Toss, 2009

1.2.1 Presença de compostos fenólicos no butiá

Muito poucos são os trabalhos científicos a respeito da caracterização química do butiá. Uma referência sobre o assunto é o trabalho de Faria et al. (2008) que caracterizaram a polpa dos frutos de butiá. Os autores trabalharam com a polpa *in natura* de 6 diferentes amostras de butiá de mesma espécie. As análises realizadas foram para a identificação, dentre outros compostos, a vitamina C, presente em teores de 38 a 73 mg/100 g de polpa e a pró-vitamina A, numa concentração entre 50 e 290 mg/100 g de polpa. Os compostos fenólicos totais também foram identificados. Representados como catequina equivalente, o teor encontrado foi entre 163 a 259 mg/100 g de polpa e, compostos fenólicos totais representados como ácido tânico, a concentração encontrada foi entre 78 e 166 mg/100 g de polpa.

1.3 Fluidos supercríticos

O ponto crítico é quando, ambas, temperatura e pressão se encontram nos valores críticos. Para valores acima do ponto crítico entende-se que a substância se encontra no estado supercrítico. O que define a escolha de um solvente para a aplicação da ESF são suas propriedades, como pressão e temperatura crítica, polaridade e poder de extração. O fluido mais empregado em processos de extração em condições supercríticas é o dióxido de carbono (CO₂), sendo que pequenas modificações na sua temperatura e pressão provocam alterações em suas propriedades, como difusividade, viscosidade e tensão superficial (MUKHOPADHYAY, 2000).

1.3.1 Propriedades dos fluidos supercríticos

Algumas substâncias, com suas respectivas temperaturas (T_c) e pressão críticas (P_c), são apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2: Temperatura e pressão críticas de algumas substâncias

Fluido	T_c (°C)	P_c (bar)
água	374,0	217,7
amônia	132,4	111,3
clorodifluorometano	96,4	48,5
clorotrifluorometano	29,0	38,7
dióxido de carbono	31,0	72,9
hexafluorido sulfúrico	45,5	37,1
monóxido de dinitrogênio	36,5	71,7
propano	96,8	42,4
triclorofluorometano	198,0	43,5
trifluorometano	25,9	46,9
xenônio	16,6	57,6
etanol ¹	240,7	61,4

Fonte: Adaptado de TAYLOR (1996).

¹Adaptado de Bruner, 1994

O dióxido de carbono é o solvente mais adequado para aplicação da tecnologia de extração com fluido supercrítico, por apresentar diversas características (BRUNER, 1994), tais como:

- é não-tóxico;
- não é inflamável;
- exibe baixa temperatura e pressão crítica, quando comparado a outras substâncias;
- apresenta grande poder de solvência;
- comercialmente é encontrado com alta pureza;
- é ambientalmente compatível, ou seja, não gera poluição.

Os estados físicos do dióxido de carbono (CO_2) podem ser descritos pelo diagrama de fases, como mostra a Figura 14. O diagrama pressão-temperatura do CO_2 apresenta três linhas que representam a sublimação, a fusão e a vaporização. Estas linhas também delimitam as regiões correspondentes ao estado gasoso, sólido e líquido. Sobre estas linhas identificam-se os pontos de equilíbrio entre duas fases. A pressão de vapor tem seu início no ponto triplo e finaliza no ponto crítico. A região de fluido supercrítico tem sua origem no ponto crítico. Neste ponto é definido um fluido supercrítico, como qualquer substância que está acima de sua pressão crítica (P_c) e temperatura crítica (T_c). A temperatura crítica é, portanto, a maior temperatura na qual um gás pode ser convertido em líquido por um incremento de pressão. A pressão crítica é, analogamente, a maior pressão na qual um líquido pode ser convertido a um gás por um incremento de temperatura. A região de fluido supercrítico caracteriza-se por apresentar apenas uma fase, com algumas das propriedades mais próximas às dos gases e outras mais próximas às dos líquidos. Dióxido de carbono subcrítico (líquido) é encontrado na região triangular formada pelas curvas de fusão, de vaporização e pela linha que define a pressão crítica (BRUNER, 1994).

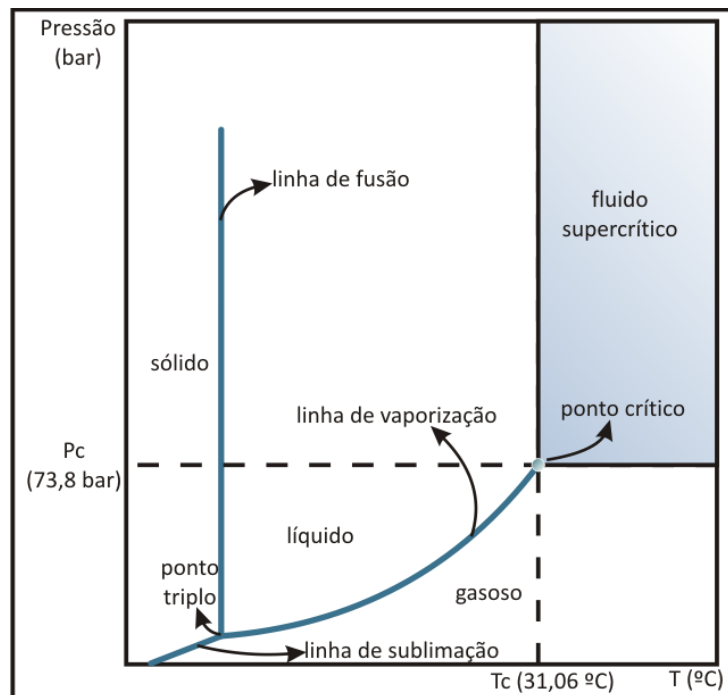


FIGURA 14: Diagrama de fases para o CO₂

Fonte: Adaptado de TAYLOR (1996).

O poder de solvência do CO₂ supercrítico tem elevada dependência com a temperatura e pressão. Ambas as propriedades influenciam na massa específica (diretamente proporcional à pressão) e na pressão de vapor – diretamente proporcional à temperatura (BRUNER, 1994). Observa-se um acréscimo da solubilidade com incrementos da massa específica. Ao mesmo tempo, um valor fixo de massa específica, provoca um acréscimo de solubilidade com o aumento da temperatura. Para uma substância, cuja temperatura está logo acima da temperatura crítica, sua massa específica eleva-se rapidamente por modestos aumentos de pressão. Por outro lado, altas pressões são necessárias para elevar a massa específica de uma substância, quando esta se encontra a uma temperatura muito acima da temperatura crítica (TAYLOR, 1996).

A Tabela 3 mostra, em maiores detalhes, a pressão (em bar) requerida para se obterem determinados valores de massa específica, em diferentes temperaturas do CO₂. Observa-se que, para elevadas temperaturas, torna-se necessário um maior incremento de pressão, quando comparado a temperaturas mais baixas, para se elevar o valor da massa específica (TAYLOR, 1996).

TABELA 3: Pressão (em bar) para cada par massa específica e temperatura do CO₂

Massa específica (g/mL)	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C	100 °C	110 °C	120 °C
1,00	526	618							
0,95	383	463	544	644	680				
0,90	281	350	420	489	518				
0,85	211	269	329	401	447				
0,80	164	213	264	314	365	416	467		
0,75	134	175	218	261	305	384	392	436	510
0,70	115	150	187	223	260	297	334	372	425
0,65	104	133	165	196	227	259	290	322	354
0,60	97	122	149	176	203	229	256	284	311
0,55	93	115	138	161	183	206	230	252	276
0,50	91	109	129	148	168	188	207	227	246
0,45	89	104	122	138	155	172	188	205	221
0,40	87	100	115	129	143	157	171	185	197
0,35	84	96	108	120	132	144	155	167	178
0,30	81	90	101	111	121	130	140	149	158
0,25	77	84	93	100	108	116	123	130	137
0,20	70	75	82	88	94	99	105	110	116

Fonte: Adaptado de TAYLOR (1996).

Fluidos supercríticos exibem propriedades físico-químicas intermediárias entre aquelas de um líquido e de um gás. Associada à elevada massa específica, que também oferece boas propriedades de solvência, os fluidos supercríticos apresentam, difusividade elevada e viscosidade baixa, quando comparados aos líquidos (BRUNER, 1994). A Tabela 4 possibilita a comparação de alguns parâmetros importantes para gases, líquidos e fluidos supercríticos.

TABELA 4: Comparação entre alguns parâmetros dos diferentes estados físicos das substâncias

	Massa específica (g/mL)	Viscosidade dinâmica (g/cm.s)	Coefficiente de difusão (cm ² /s)
<i>Gás (ambiente)</i>	0,0006 – 0,002	0,0001 – 0,003	0,1 – 0,4
<i>Fluido supercrítico (T_c, P_c)</i>	0,2 – 0,5	0,0001 – 0,0003	0,0007
<i>Líquidos (ambiente)</i>	0,6 – 1,6	0,002 – 0,03	0,000002 – 0,00002

Fonte: Adaptado de TAYLOR (1996).

1.3.1.1 Fluidos supercríticos modificados

O poder de dissolução é, também, influenciado pela polaridade do solvente. Por regra, solventes polares dissolvem moléculas polares e solventes apolares dissolvem moléculas com mesma polaridade. Assim, a capacidade de solvência do CO₂ é limitada pela sua natureza apolar, podendo atuar na dissolução de moléculas apolares. Essa limitação pode ser contornada pela adição de outras substâncias ao CO₂, chamadas de modificadoras de polaridade, ou também de cossolventes. Um cossolvente para o CO₂ é, normalmente, um líquido polar nas condições ambientes. A mistura entre CO₂ e cossolvente gera complicações no comportamento de fases, uma vez que a temperatura e a pressão crítica do CO₂ são alteradas. A temperatura crítica da mistura se encontra entre aquelas dos dois componentes puros. Da mesma forma, a pressão crítica apresenta um valor entre o do CO₂ puro e o do líquido modificador puro. Assim como a adição de um cossolvente eleva o poder de solvência, o efeito da transferência de massa também pode ser alterado, especialmente se o cossolvente interagir com o soluto (TAYLOR, 1996).

1.4 Extração com fluido supercrítico (EFS)

A extração com fluido supercrítico, ou simplesmente EFS, é caracterizada pelo contato direto e contínuo do solvente (fluido supercrítico) com o substrato, que é mantido na forma de um leito fixo. Desta forma, o solvente passa através do leito e extrai os compostos de interesse. Duas principais etapas descrevem esse processo: a extração e a separação da mistura de solvente e extrato (BRUNNER, 1994). A Figura 15 mostra esquematicamente um processo de extração com fluido supercrítico com reciclo do CO₂. O equipamento utilizado no processo é composto basicamente por um vaso extrator, uma válvula de redução de pressão (restritor), um vaso de separação e uma bomba de alta pressão. A matriz de extração é alimentada no vaso extrator. O fluido supercrítico atravessa a matriz e realiza a extração dos compostos de interesse. A mistura de CO₂ e compostos extraídos passam inicialmente por uma válvula, onde é reduzida a pressão, e, após, chegam ao vaso separador. Neste vaso os compostos

extraídos são separados do CO₂, que, por sua vez, retorna ao processo na forma de reciclo e, os extratos são, então, coletados (MUKHOPADHYAY, 2000).

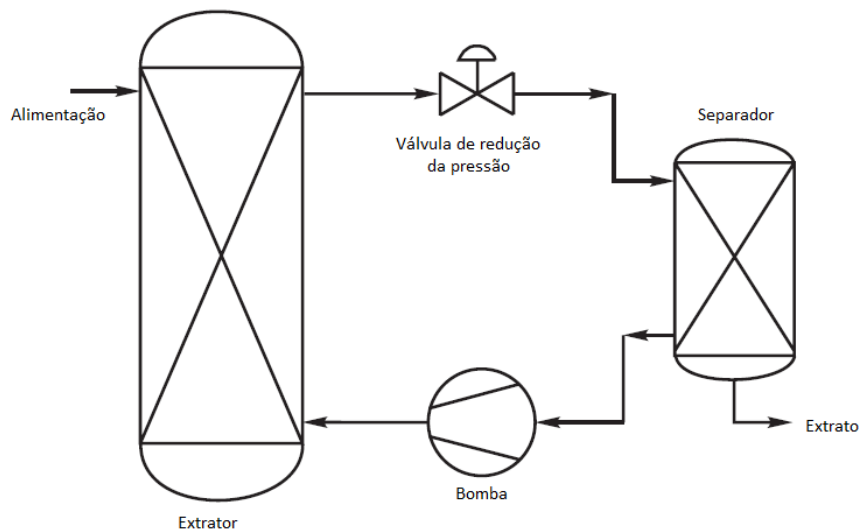


FIGURA 15: Esquema do processo de ESF

Fonte: MUKHOPADHYAY, 2000 (traduzido pelo autor)

1.4.1 Bombas para o solvente

Na maioria dos sistemas analíticos de EFS, o fornecimento de fluido supercrítico é baseado em bombas de pistão, ou então, de seringa. Estes tipos de bomba, apesar de apresentarem elevado custo, permitem trabalhar numa grande faixa de vazão, além de proporcionar uma dosagem precisa (TAYLOR, 1996). Uma característica negativa das bombas de pistão e seringa é o fluxo pulsado, uma vez que a vazão cessa no momento em que a bomba é alimentada. Uma alternativa para contornar esta situação é o emprego de duas ou mais bombas ou a sua substituição por bombas de diafragma, onde a vazão fornecida é contínua. Nos processos que fazem uso de fluidos supercríticos a pressão de saída da bomba é, geralmente, elevada. Assim, torna-se necessário o resfriamento da cabeça da bomba, evitando a cavitação (YORK, KOMPELLA e SHEKUNOV, 2004).

1.4.2 Vaso de extração

Vasos de extração utilizados em processos supercríticos são fabricados comumente, em aço inoxidável do tipo 316. As mais importantes características dos vasos são a capacidade de resistir às altas pressões e a ausência de vazamentos. O formato de um vaso normalmente é longo e com diâmetro reduzido. Este formato permite uma melhor vedação e resistência à pressão, porém o perfil não interfere nos resultados da extração (TAYLOR, 1996).

1.4.3 Adição de cossolvente

Cossolventes podem ser introduzidos diretamente no fluido ou no vaso de extração, sobre a matriz. A forma de adição no fluido pode ser por mistura prévia no cilindro ou, então, por intermédio de uma bomba específica para o cossolvente. Alguns problemas são identificados quando o cossolvente é misturado no cilindro como, por exemplo, o cossolvente pode ficar no fundo do cilindro, sendo obrigatória uma agitação constante. Além disto, cilindros com a mistura pronta, na fração desejada, devem estar disponíveis comercialmente (TAYLOR, 1996).

A forma de adição por intermédio de uma bomba específica para o cossolvente é outra alternativa. Porém este método requer um sistema mais sofisticado de bombeamento. Um critério que deve caracterizar uma bomba de cossolvente é a precisão na dosagem, uma vez que a fração de cossolvente é uma variável importante de estudo. Usualmente, bombas do tipo seringa são empregadas para a dosagem precisa, uma vez que estas são capazes de adicionar pequenas quantidades de cossolvente diretamente na célula de extração.

A escolha da forma de se introduzir o cossolvente depende das características da matriz de extração e dos analitos. Se o cossolvente tem a capacidade de quebrar a interação entre a matriz e o analito, a introdução direta na matriz é a mais recomendada, com a finalidade de maximizar o efeito do modificador. Porém alguns problemas são identificados como, por exemplo, se a matriz apresentar um volume elevado, a quantidade de cossolvente pode não ser suficiente para banhar toda a matriz (TAYLOR, 1996).

1.4.4 Leito de extração

Torna-se importante a análise do leito de extração para entender o mecanismo de transporte de substâncias através dele. O transporte de substâncias da fase sólida para o fluido de extração pode ocorrer tanto na superfície como no interior das partículas, ou seja, ele é dependente da morfologia das partículas e do leito formado por elas. Quando se trabalha com partículas vegetais, algumas variáveis como espécie da planta, época de colheita e tratamento pós-colheita influenciam na formação da matriz de extração. Outro fator relevante, o qual influencia diretamente na formação do leito, é o tratamento aplicado antes da extração, como por exemplo, moagem e separação granulométrica. Muitas outras questões podem ser avaliadas com a finalidade de caracterizar o meio vegetal de extração. Um exemplo disto é a localização das substâncias de interesse para a extração, que podem estar adsorvidas na superfície das partículas e, muitas vezes, no interior das células vegetais (BRUNER, 1994).

A sequência de mecanismos de transporte é descrita pelas seguintes etapas (BRUNER, 1994):

- a matriz vegetal absorve o solvente supercrítico e outros fluidos possivelmente acrescidos no processo. A estrutura da célula dilata, ou seja, a membrana celular e os canais intercelulares são alargados. A resistência ao transporte de massa é, então, reduzido;
- em paralelo, os compostos miscíveis são dissolvidos pelo solvente;
- os compostos miscíveis são transportados para a superfície externa do sólido. Difusão é o mecanismo mais importante observado;
- os compostos dissolvidos passam através da superfície externa do sólido. Uma mudança de fase pode ocorrer neste local;
- os compostos são transportados da camada superficial para o solvente supercrítico e, então, removidos da superfície da matriz vegetal.

1.4.5 Restritor

Restritores são utilizados para regular a pressão de operação e se localizam imediatamente após a célula de extração. Para esta função, são utilizados tubos capilares de sílica ou válvulas micrométricas. Os tubos capilares restringem a passagem do fluido pelo minúsculo diâmetro do orifício. Uma desvantagem é a impossibilidade de se trabalhar com vazões variadas. As válvulas micrométricas são os restritores mais comuns e permitem variar a vazão de operação. Dois tipos de válvulas micrométricas são empregados, as de controle manual e as de controle automático (TAYLOR, 1996).

Ao passar pelo restritor, principalmente do tipo válvula micrométrica, o fluido sofre uma descompressão brusca, atingindo a pressão ambiente, e sua temperatura decresce rapidamente. Para que não ocorra congelamento na válvula, torna-se necessário o fornecimento de calor.

1.4.6 Coleta dos extratos

Para bem avaliar o rendimento na extração, torna-se necessária a coleta total dos extratos. Cada composto presente nos extratos apresenta um nível de dificuldade de coleta. Compostos mais voláteis são naturalmente mais difíceis de serem coletados, sendo a dificuldade diminuída na medida em que a volatilidade diminui.

Elementos capazes de aprisionar os extratos são chamados de coletores, que podem ser sólidos (ativos ou inertes), líquidos ou simplesmente constituídos por um frasco vazio.

Um coletor sólido inerte é formado por um leito poroso de vidro, de aço inoxidável ou qualquer outro material que não sofra reação quando em contato com o extrato. O que se observa num coletor desta morfologia é a aderência dos compostos precipitados dos extratos no leito, permitindo apenas a passagem do CO₂ no estado gasoso. O resfriamento a baixas temperaturas pode auxiliar consideravelmente a aderência. Após a extração, este tipo de coletor necessita passar por uma lavagem com solvente orgânico para a recuperação dos extratos precipitados. Baseados no mesmo conceito estão os coletores constituídos por frascos vazios, porém estes devem necessariamente permanecer sob refrigeração. Um coletor de frasco vazio

apresenta vantagem por não necessitar o emprego de solventes de lavagem, podendo o extrato, passar diretamente para o procedimento analítico (TAYLOR, 1996).

Membranas também se comportam como coletores sólidos inertes na ESF. As vantagens relacionadas em sua utilização é a possibilidade de coletar o extrato na pressão supercrítica, sem a necessidade de restritor. Desta forma o CO₂, livre dos compostos extraídos e com pressão elevada, pode retornar ao processo na forma de reciclo, aumentando a viabilidade econômica da ESF (CARLSON et al., 2005).

Um coletor sólido ativo é confeccionado com material capaz de interagir com os compostos do extrato. Além de realizar o aprisionamento, este tipo de coletor pode apresentar, dependendo da escolha do material, uma seletividade para determinados compostos. A disposição em série de coletores ativos de diferentes seletividades pode, desta forma, realizar uma separação dos extratos (TAYLOR, 1996).

Coletores líquidos estão entre os mais comuns e de mais simples emprego. Sua utilização envolve a descompressão diretamente em um frasco contendo um solvente orgânico (metanol pode ser empregado como solvente para compostos polares e diclorometano para compostos apolares). Os compostos do extrato são dissolvidos no solvente, enquanto que o CO₂ despressurizado é ventilado para o ambiente (TAYLOR, 1996).

1.4.7 Aplicações da ESF

A ESF é atualmente conhecida por ser um processo rápido e sem geração de contaminantes aplicada na indústria alimentícia, farmacêutica, entre outras. A extração em larga escala é aplicada desde 1970, para a remoção de cafeína de café e chá, para o refino de óleos comestíveis e a obtenção de fragrâncias e aromas de especiarias, lúpulo e outros vegetais (MUKHOPADHYAY, 2000). Na Tabela 5, são listados alguns processos conhecidos.

Sabe-se que vegetais são ricos de compostos fenólicos. A extração destes compostos pode fornecer uma valiosa fonte de produtos naturais, que atuam como antioxidantes (MUKHOPADHYAY, 2000). Muitos são os estudos da aplicação da ESF na obtenção de compostos antioxidantes, alguns exemplos são resumidos em sequência.

TABELA 5: Aplicações de EFS

Descafeinização de café e chás
Extração de óleos e oleoresina de especiarias
Extração de óleos de sementes vegetais
Obtenção de fragrâncias, aromas e perfumes
Extração do lúpulo amargo
Extração de fitoterápicos
Estabilização de sucos de frutas
Extração de lanolina da lã
Remoção de gorduras de <i>fast foods</i>
Remoção de colesterol de gema de ovo e tecidos animais
Extração de antioxidantes a partir de materiais vegetais
Extração de corantes alimentares naturais
Remoção da nicotina do tabaco

Fonte: adaptado de Mukhopadhyay, 2000

Yu et al. (2007) utilizaram a EFS para a obtenção de naringina das sementes de toranja. As sementes foram inicialmente desidratadas e moídas, sendo utilizadas 35 g em cada experimento. CO₂ foi utilizado nos experimentos juntamente ao etanol, utilizado como cossolvente. A taxa volumétrica de CO₂ foi de 5 L/min e as variáveis analisadas foram pressão (345, 414 e 483 bar), temperatura (40, 50 e 60°C) e teor de cossolvente adicionado nas relações volumétricas de 10, 20 e 30% frente ao volume de CO₂. O tempo de extração foi de 40 min. Os maiores rendimentos em naringina foram encontrados nas condições de 414 bar, 50°C e 20% de cossolvente, resultando em 20 mg de naringina/100 g de sementes desidratadas.

Piantino et al. (2008) aplicaram a EFS para a obtenção de compostos fenólicos das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. As folhas foram desidratadas com circulação forçada de ar a 40°C, moídas e guardadas a -10°C. O equipamento utilizado no trabalho tinha vaso de extração com capacidade de 50 mL. 7 g de folhas moídas foram colocadas no interior da célula de extração e 0,624 kg de CO₂ foi bombeado. Esse processo inicial permaneceu por 20 min em equilíbrio. Na sequência, CO₂, sem adição de cossolvente, foi acrescentado à célula a uma taxa de 0,144 kg/h. As variáveis estudadas foram pressão (200, 300 e 400 bar) e temperatura (40, 50 e 60°C). Outra variável estudada foi o tempo, sendo avaliados os rendimentos como função da massa de CO₂ alimentada na célula. Os maiores rendimentos obtidos foram nas condições de

60°C e 400 bar, resultando em 409,7 mg de compostos fenólicos/100 g de folhas desidratadas.

Wang et al. (2008) estudaram a EFS na obtenção de flavonóides das raízes de *Pueraria lobata*. As raízes foram desidratadas e moídas. 40 g de raízes foram colocadas no vaso do equipamento de extração de capacidade de 250 mL. A extração iniciou por um período estático de 10 min, seguido por mais 80 min, onde CO₂ foi bombeado a uma taxa volumétrica de 20 L/h. Etanol foi adicionado como cossolvente nos volumes de 0,1, 0,15 e 0,2 L. Outras variáveis analisadas foram a pressão (150, 200 e 250 bar) e temperatura (40, 50 e 60°C). Os rendimentos em flavonóides foram expressos com rotina equivalente (RE). As melhores condições de extração foram 200 bar, 50°C e 0,15 L de cossolvente, resultando em 1730 mg de RE/100 g de raízes desidratadas.

Cassas et al. (2010) extraíram resveratrol (RES) do resíduo vinícola da espécie *Palomino fino*. O resíduo foi coletado ainda úmido na vinícola e, em seguida, desidratado em forno mantido a 60°C no período de 48h. O resíduo foi separado em bagaço, sementes, engaço e casca, sendo todas as partes moídas. 4,6 g de cada amostra foram utilizados para os experimentos. O equipamento utilizado apresentou vaso de extração com capacidade de 10 mL e a taxa de solvente (CO₂ e cossolvente) aplicada foi de 0,048 kg/h. As variáveis analisadas foram pressão (100 e 400 bar) e temperatura (35 e 55°C). Os testes foram realizados com e sem a presença de cossolvente (etanol). Nas extrações com cossolvente foram adicionados 5% de etanol. Os melhores rendimentos em RES foram encontrados nas condições de 400 bar e presença de cossolvente. Para as sementes e o bagaço a melhor temperatura foi de 55°C, resultando em 11,1 mg de RES/100 g e 19,2 mg de RES/100 g de sementes e bagaço desidratado, respectivamente. Já para os engaços e as cascas, a melhor temperatura foi de 35°C, totalizando 0,9 mg de RES/100 g e 49,1 mg de RES/100 g de engaços e cascas desidratados, respectivamente.

Gelmez, Kincal e Yener (2009) obtiveram antioxidantes do germe de trigo torrado, utilizando EFS. O germe de trigo, composto de partículas com tamanho de 0,75 mm, foi torrado a uma temperatura de 216°C por 7 min e guardado a uma temperatura de -18°C. A taxa de CO₂ utilizada nos experimentos foi constante e igual a 0,12 kg/h, sem a adição de cossolvente. As variáveis analisadas foram pressão (148 a 602 bar), temperatura (40 a 60°C) e tempo de extração (10 a 60 min). Os extratos foram

quantificados quanto aos compostos fenólicos totais (CFT), representados como ácido gálico equivalente (AGE). Os melhores resultados foram encontrados nas condições de 240 bar, 56°C e 20 min de extração, resultando em 26,4 mg de AGE/100 g de germe de trigo torrado.

Liza et al. (2010) aplicaram a EFS para a obtenção de flavonóides das folhas de *Strobilanthes crispus*. As folhas foram desidratadas em forno com circulação forçada de ar a 40°C por 24h e guardadas em ambiente escuro. Para os experimentos as folhas foram moídas, resultando em partículas com tamanho de 0,5 mm, sendo utilizadas 30 gramas em cada corrida experimental. O equipamento utilizado no experimento apresentou vaso de extração com capacidade de 500 mL. A taxa de CO₂ empregada foi de 0,6 kg/h e a taxa de etanol, utilizado como cossolvente, foi de 0,06 kg/h, resultando num teor mássico de cossolvente de 9,1%. As variáveis analisadas foram pressão (100, 150 e 200), temperatura (40, 50 e 60°C) e tempo de extração (40, 60 e 80 min). Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As melhores condições de extração foram definidas como 200 bar, 50°C e 60 min, resultando em 3,98 mg de flavonóides/100 g de folhas desidratadas.

Cavero et al. (2006) trabalharam com a EFS aplicada às folhas de orégano. As folhas foram desidratadas e moídas, resultando num teor de umidade de 16% e tamanho de partícula de 0,25 a 0,50 mm. O vaso do extrator utilizado no equipamento apresentou volume de 285 mL. 75 g de folhas foram utilizadas em cada corrida experimental. As variáveis analisadas foram pressão (150, 250 e 350 bar) e temperatura (40 e 60°C). Etanol foi adicionado como cossolvente nos níveis de 0, 4 e 7%. Os rendimentos foram expressos como massa total de extrato/100 g de folhas desidratadas. Os extratos foram avaliados quanto ao poder de redução do radical DPPH•. A corrida com condições de 250 bar, 40°C e 4% de cossolvente apresentou maior atividade antioxidante.

Chiu et al. (2002) estudaram a EFS para a obtenção de flavonóides das folhas de *Ginkgo*, obtidas comercialmente. As folhas foram moídas e 20 g foram utilizadas em cada corrida. O equipamento utilizado apresentou vaso de extração de 300 mL e a taxa de CO₂ foi de 5 mL/min. As variáveis analisadas foram pressão (242 e 312 bar) e temperatura (60, 70, 80 e 120°C). Etanol foi adicionado como modificador de polaridade, nas concentrações molares de 5, 10, 12 e 24%. Os melhores rendimentos

foram encontrados nas condições de 312 bar, 60°C e 24% de cossolvente, resultando em 134,2 mg de flavonóides/100 g de folhas.

Castro-Vargas et al. (2010) estudaram a EFS para a obtenção de compostos fenólicos a partir das sementes de goiaba, obtidas dos resíduos das indústrias de geléias. As sementes foram lavadas e desidratadas a temperatura ambiente até umidade de 11,8%. Em cada corrida experimental foram utilizadas 30 g de sementes moídas com partículas com tamanho de 0,2 a 0,5 mm. O vaso de extração do equipamento utilizado apresentou capacidade de 50 mL. As variáveis estudadas foram pressão (100, 200 e 300 bar) e temperatura (40, 50 e 60°C). Etanol a 10% mássico foi utilizado como cossolvente. O método empregado iniciou-se pela pressurização da célula de extração com CO₂ e etanol, já com as sementes, permanecendo por 30 min. Na sequência a célula foi despressurizada e os extratos coletados. Este procedimento foi repetido por 4 vezes, totalizando 2h de extração. As melhores condições encontradas neste trabalho foram pressão de 100 bar e temperatura de 60°C, fornecendo um rendimento em CFT de 153 mg de AGE/100 g de sementes desidratadas.

Bimakr et al. (2010) aplicaram a EFS para a obtenção de flavonóides a partir das folhas de menta. As folhas foram desidratadas em forno com circulação de ar a 40°C, por 24h. 30 g de folhas moídas, com tamanho de partículas de 0,525 mm. O equipamento utilizado no estudo apresentou capacidade de 500 mL. A taxa mássica de CO₂ empregada foi de 0,9 kg/h. etanol foi utilizado com cossolvente, bombeado a uma taxa de 0,18 kg/h, resultando num teor de cossolvente de 16,7%. As variáveis investigadas foram a pressão (100, 200 e 300 bar), temperatura (40, 50 e 60°C) e tempo de extração (30, 60 e 90 min). Os extratos foram analisados por CLAE. Os melhores rendimentos foram encontrados nas condições de 200 bar, 60°C e 60 min de extração. Nestas condições foi encontrada a catequina (0,85 mg/100 g de folhas desidratadas), a epicatequina (0,95 mg/100 g de folhas desidratadas), a rutina (0,90 mg/100 g de folhas desidratadas), a miricetrina (0,71 mg/100 g de folhas desidratadas), a luteolina (3,98 mg/100 g de folhas desidratadas), a apigenina (1,64 mg/100 g de folhas desidratadas) e a naringenina (1,51 mg/100 g de folhas desidratadas).

A tecnologia de extração com fluido supercrítico pode ser aplicada para a obtenção de compostos fenólicos utilizando, ou não, cossolventes como modificadores de polaridade. A faixa de pressão estudada nos diferentes trabalhos varia de 100 a 600 bar e a faixa de temperatura avaliada é de 35 a 120°C.

2 Pré-operação do equipamento piloto de EFS

Previamente à etapa experimental de EFS neste trabalho, foi necessária a realização da pré-operação no equipamento piloto de extração. O equipamento foi projetado e montado pela empresa de projetos TRENDTECH. A pré-operação permitiu realizar testes com o equipamento, além da descrição dos processos de manutenção e segurança operacional.

O fluxograma do processo de EFS, que descreve o equipamento presente no laboratório de Óleos Essenciais da Universidade de Caxias do Sul, pode ser visto na Figura 16. Este equipamento foi utilizado para a execução do presente trabalho.

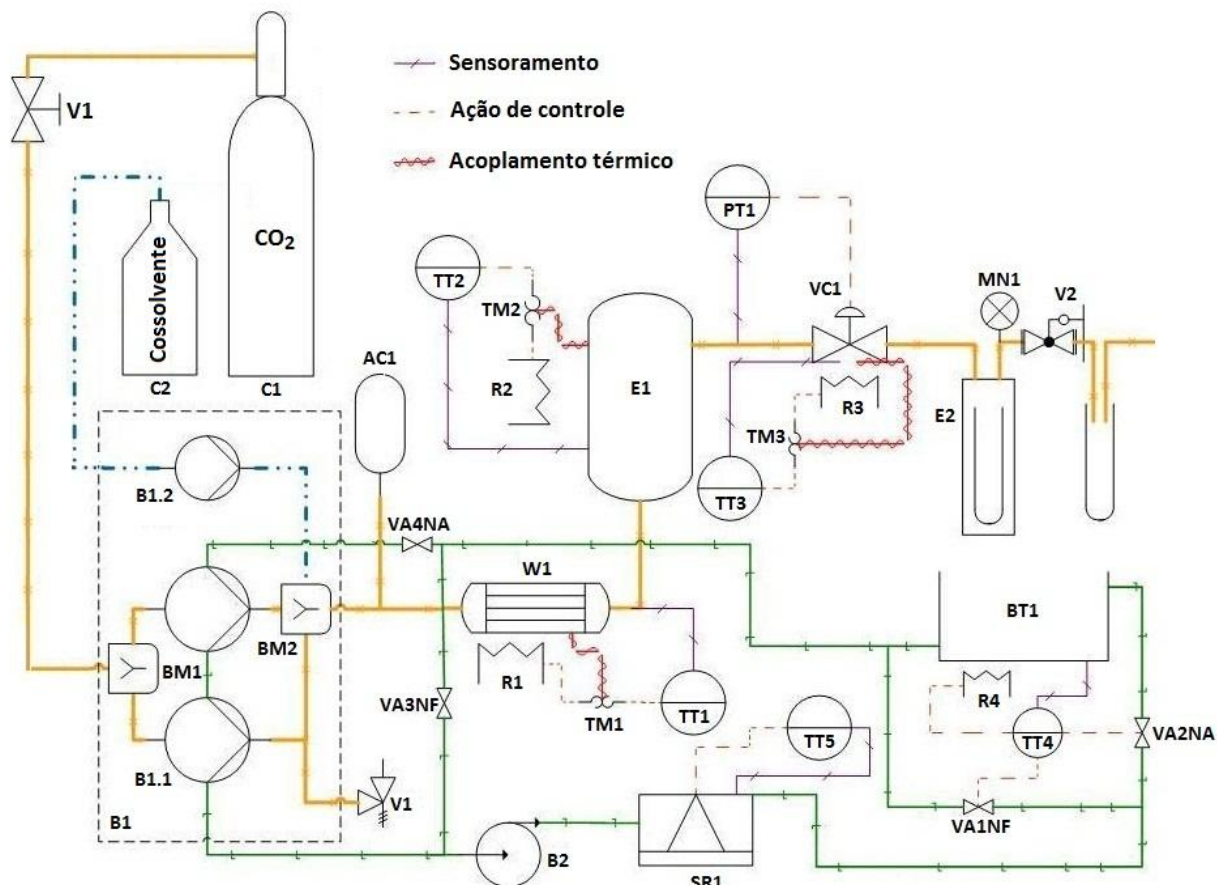
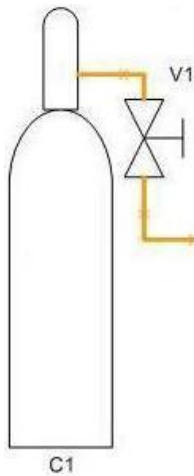


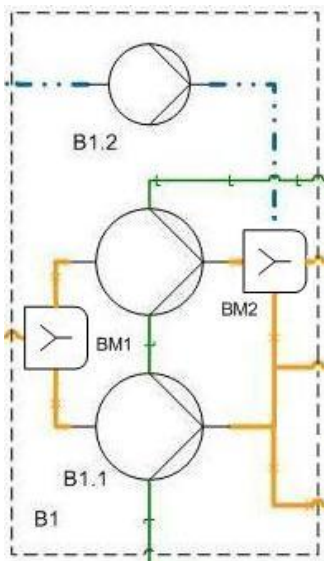
FIGURA 16: Fluxograma do processo de EFS

A seguir é apresentada uma descrição dos componentes do equipamento:



Vaso do solvente (C1): disponibiliza o solvente de extração. Para o caso específico são utilizados cilindros comerciais de CO₂ no estado líquido. A alimentação de CO₂ é acionada pela abertura da válvula V1, que está acoplada ao cilindro.

Vaso de cossolvente (C2): disponibiliza o cossolvente para ser utilizado em processos que requerem um modificador de polaridade. Normalmente o vaso C2 é o próprio recipiente do cossolvente.



Bomba (B1) do tipo diafragma e da marca ProMinent®-Dosadora Orlita Triplex: é composta por três cabeças. Duas delas (B1.1) são responsáveis pelo bombeamento do solvente de extração sendo a terceira (B1.2) responsável pelo bombeamento do cossolvente. A conexão BM1 divide o fluxo de CO₂ para as duas cabeças. A conexão BM2 une o fluxo de CO₂ com o fluxo de cossolvente, ambos efluentes da bomba.

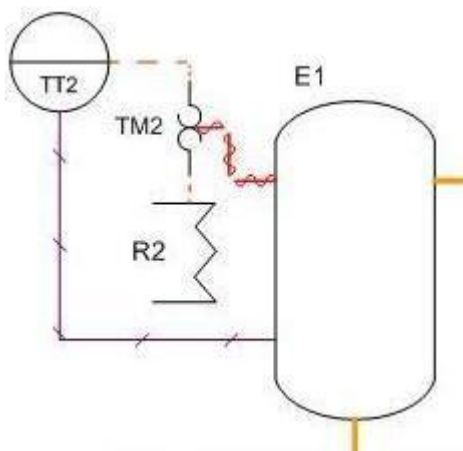
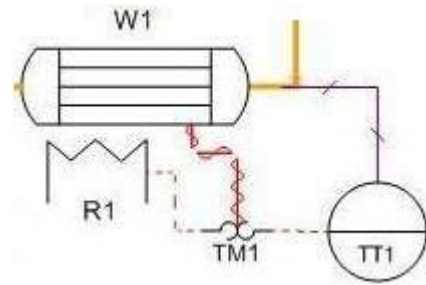
Acumulador (AC1): minimiza a pulsação de pressão ocasionada pela bomba, de forma a auxiliar na manutenção da pressão do vaso de extração.



Válvula de segurança (V1): dispositivo mecânico responsável pela segurança operacional do equipamento. É uma válvula do tipo

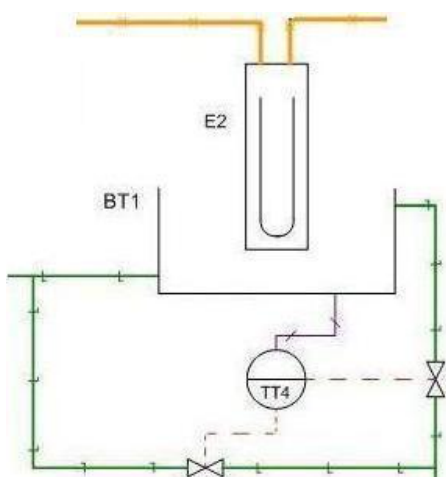
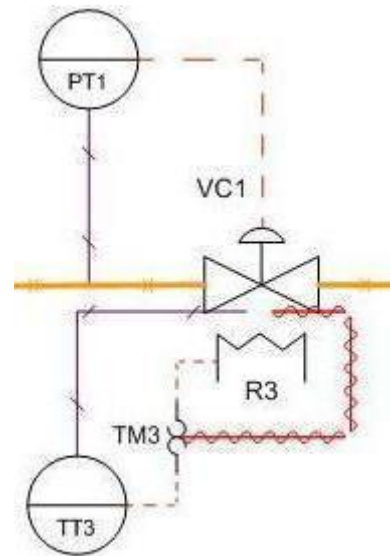
alívio (marca W.Burguer modelo 2602) ajustada para ser acionada automaticamente quando a pressão atingir o valor de 300 bar.

Pré-aquecedor (W1): composto por uma câmara de aço inoxidável envolta por uma resistência térmica (R1), fica localizado antes do extrator. É responsável pelo aquecimento prévio do fluido de extração, para que este se encontre na temperatura desejada antes de entrar no vaso de extração. A temperatura do pré-aquecedor é medida pelo sensor TT1, do tipo termopar e localizado na parede externa, e controlada pelo termostato TM1.



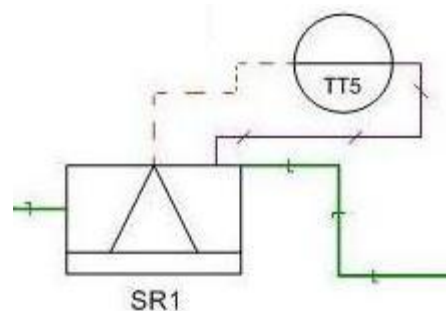
Vaso extrator (E1): local onde ocorre a extração. O vaso tem capacidade de 1L e é confeccionado em aço inoxidável, que pode ser operado até a pressão de 400 bar e temperatura de 100°C. Seu aquecimento é realizado pela resistência R2 localizada na parede externa do vaso. A temperatura é medida pelo sensor TT2 (do tipo termopar, localizado na parede externa do vaso) e controlada pelo termostato TM2.

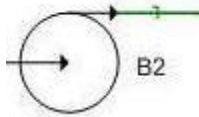
Válvula de controle automática (VC1): do tipo agulha. É responsável por manter a pressão no interior do vaso extrator no valor desejado. O Sensor eletrônico PT1 (marca © Huba Control, modelo 5436) tem a função de medir a pressão na linha após o vaso de extração e enviar esta informação para o acionador da manopla da válvula VC1. A válvula VC1 permanece imersa num banho de óleo que é aquecido pela resistência térmica R3. A temperatura é medida pelo sensor TT3, do tipo PT100, e controlada pelo termostato TM3.



Vaso de coleta do extrato (E2): vaso onde é coletado e separado o extrato do solvente. Foi confeccionado com frascos do tipo Erlenmeyer de vidro e apresenta dois estágios de coleta, garantido, assim aprisionamento total dos extratos. Os frascos de Erlenmeyer permanecem imersos num banho (BT1) contendo fluido refrigerante (etileno glicol e água). A temperatura do banho é medida pelo sensor TT4 do tipo PT-100.

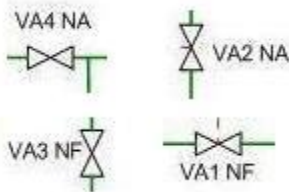
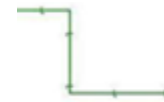
Sistema de resfriamento (SR1): Marca Embraco-Aspera, modelo J9226E. É responsável pelo fornecimento de fluido refrigerante (mistura de etileno glicol e água) para as duas cabeças de bombeamento de CO₂ B1.1 e para o banho do vaso de coleta E2. A leitura da temperatura é feita pelo sensor TT5 presente no sistema de resfriamento do fabricante.





Bomba do fluido refrigerante (B2): bomba do tipo centrífuga (Marca Imobras, modelo 16.001.24). Bombeia o fluido refrigerante ao longo da linha de resfriamento.

As tubulações, onde circulam os fluidos a altas pressões, são confeccionadas em aço inoxidável com diâmetro nominal de ½".

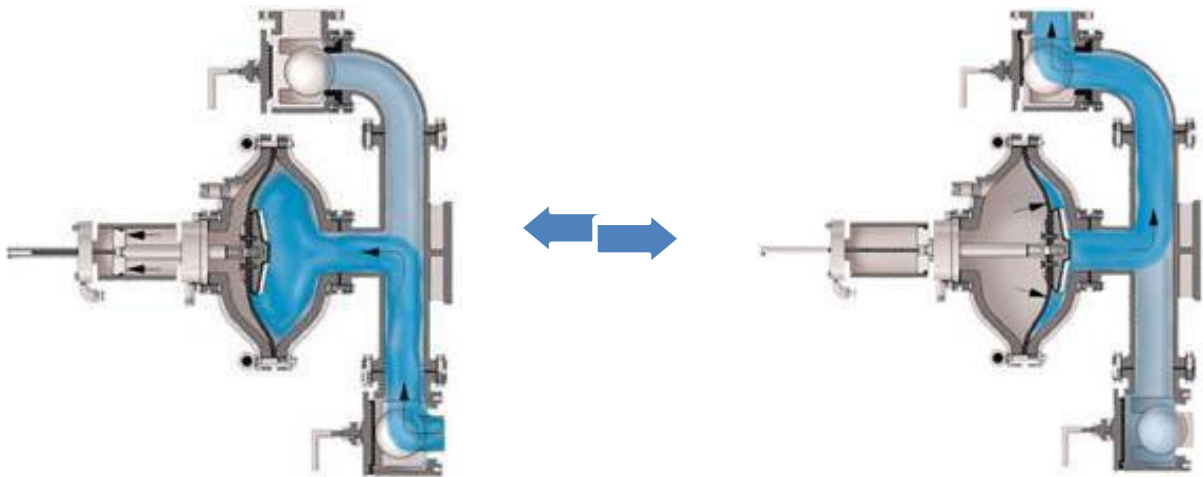


Válvulas solenóides (VA1 NF, VA2 NA, VA3 NA e VA4 NA): são responsáveis pelo direcionamento do fluxo do fluido refrigerante.

O sistema de controle e monitoramento do processo é feito mediante a um *software* desenvolvido pela empresa TRENDTECH. O *software* permite a operação do equipamento e a visualização das variáveis do processo.

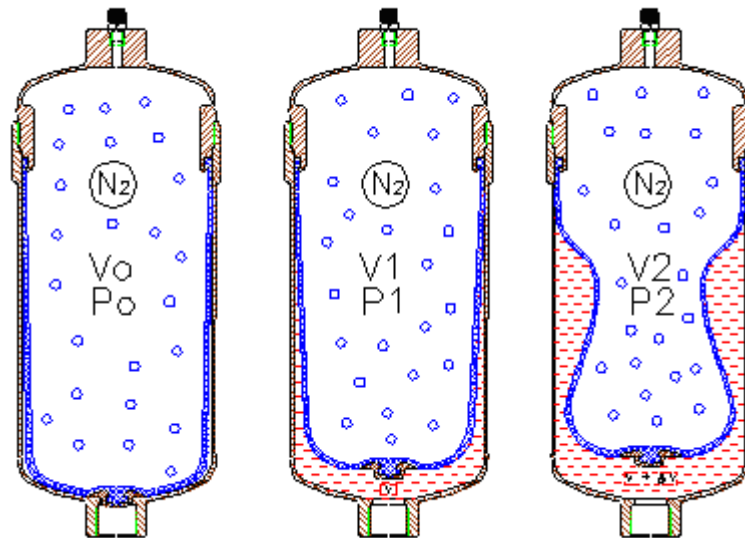
O equipamento de EFS foi projetado para operar com CO₂ como solvente. Como cossolvente é possível trabalhar com água, metanol, etanol, entre outros compostos polares. O suprimento de CO₂, para duas das três cabeças da bomba, é feito por um cilindro do tipo pescador que contém o solvente no estado líquido, em sua pressão de vapor, aproximadamente 59 bar, na temperatura ambiente. Desta forma, o fornecimento do CO₂ na linha de sucção é no estado líquido, requisito essencial para a operação da bomba. O cossolvente é fornecido para a terceira cabeça, de tamanho menor das cabeças de bombeamento do CO₂.

O funcionamento da bomba é por diafragma, como mostra a Figura 17, o fluido entra no momento em que o pistão da bomba é retraído e, na sequência, impulsionado quando o pistão é deslocado em seu curso máximo. É possível ajustar o curso do pistão para cada cabeça da bomba (chamado de Stroke), além de variar a frequência de rotação do motor, desta forma o fluxo na saída da bomba é variável, podendo ser ajustado para cada estudo.

**FIGURA 17: Bomba de diafragma**

Fonte: D.J. Gongol and Associates, Inc

Apesar de a bomba possuir duas cabeças reservadas para o CO_2 , o fluxo efluente apresenta oscilações de pressão durante o bombeamento. Uma forma de evitar essas oscilações é a instalação de um acumulador (marca Hidracar S.A., modelo U003A41E-A1½”), que funciona como amortecedor de pulsação, imediatamente após a bomba, na linha de recalque. O acumulador é constituído por uma câmara de metal, que, em seu interior, se encontra uma bexiga de borracha pressurizada, geralmente com gás nitrogênio, a uma pressão abaixo da pressão de trabalho existente na linha (70 a 90%). No momento em que o equipamento não está pressurizado a bexiga se encontra no volume V_0 e na pressão P_0 , como pode ser visto na Figura 18. Quando o equipamento está em uso, o fluxo emitido no estágio de compressão da bomba é dividido em duas partes, uma delas permanece na linha de recalque, enquanto que a outra entra no acumulador. No momento em que a bomba está no estágio de sucção, o volume armazenado no acumulador retorna imediatamente à linha. Os valores P_1 e P_2 são as pressões mínima (estágio de sucção da bomba) e máxima (estágio de compressão), respectivamente, aceitas durante o seu funcionamento.

**FIGURA 18: Acumulador**

Fonte: Hidracar S.A.

Ao sair do sistema de bombeamento o solvente (ou mistura de solvente e cossolvente) passa por um pré-aquecedor antes de entrar no vaso de extração. O vaso de extração é fabricado pela usinagem de um cilindro maciço de aço inoxidável. A capacidade do vaso é de 1 L, ele fica na posição vertical e o fluido entra na sua parte inferior. A saída fica na lateral superior do vaso. A matriz de extração é introduzida por uma abertura na parte superior do vaso, já colocada em um cesto fabricado em malha de aço inoxidável.

Na tubulação de saída do vaso de extração se encontra o sensor de pressão, e a válvula de controle de pressão. Devido à válvula de controle não fechar totalmente, necessita-se a colocação de uma válvula do tipo esfera, localizada anteriormente à válvula de controle. No momento de carga do vaso de extração a válvula esfera permanece fechada, após a carga estar completa esta válvula se abre e a válvula de controle passa a atuar em resposta aos dados emitidos pelo sensor de pressão. A função da válvula de controle é manter constante a pressão de operação no interior do vaso de extração e atuar como restritor para a separação do CO_2 dos extratos. Como ocorre uma expansão do CO_2 na válvula de controle (do estado supercrítico para o estado gasoso), é necessário o fornecimento de calor, a fim de evitar o congelamento, para isto, a válvula permanece imersa num banho de óleo aquecido a uma temperatura de $80^\circ C$.

A coleta dos extratos obtidos é feita em um vaso imerso em banho de resfriamento a uma temperatura de aproximadamente $3^\circ C$. A mistura de CO_2 gasoso e extrato,

proveniente do restritor, passa pelo vaso e entra em contato com a parede resfriada, onde o extrato fica aprisionado e, então, o CO₂ é liberado para a atmosfera.

2.1 Teste hidrostático

O teste hidrostático consiste na pressurização do sistema, até o limite de segurança, estabelecido em 300 bar, utilizando água como fluido. A finalidade deste teste é verificar a resistência à pressão das partes que compõem o equipamento de EFS. Com o teste também é possível determinar se a bomba é capaz de atingir as pressões requeridas para o processo e eliminar os possíveis vazamentos ao longo da tubulação.

Ao final do teste, concluiu-se que a tubulação localizada antes do vaso extrator não apresentou vazamento. O vaso extrator apresentou um pequeno vazamento no orifício da tampa, no qual ficava um termopar para medição da temperatura interna do vaso, a solução para este vazamento foi eliminar a medição da temperatura, fechando o orifício com um tampão, sendo a temperatura monitorada apenas pelo termopar localizado na parede externa do vaso de extração. A tubulação disposta após o vaso de extração apresentou vazamentos, os quais foram sanados após ajuste no sistema de junção dos tubos.

2.2 Calibração do acumulador

As especificações para o acumulador sugerem pressões para a bexiga de 70 a 90% da pressão existente na linha trabalho. Levando em conta que os experimentos requerem diferentes pressões de operação, é necessária a calibração do acumulador para cada diferente condição experimental, feita através de um cilindro de nitrogênio. O problema decorrente de uma pressão na bexiga abaixo da especificada é o esmagamento da bexiga, podendo até provocar sua ruptura. Uma pressão acima da especificada faz com que a atuação do acumulador fique prejudicada, pois a elevada pressão no interior da câmara não permite a entrada do fluido de trabalho.

2.3 Curva de vazão da bomba

2.3.1 Dióxido de carbono

Para as extrações, realizadas com o equipamento, torna-se necessário o conhecimento da vazão de alimentação de solvente na célula de extração. A forma encontrada para solucionar esta deficiência de dados, já que o equipamento não conta com um instrumento para medição do fluxo, foi o levantamento de curvas de calibração de vazões para a bomba. As variáveis para a bomba são a frequência de rotação aplicada ao motor que impulsiona a bomba, que é fornecida pelo motor da bomba e manipulada pelo software e o *stroke* (faixa de percurso de deslocamento do pistão da bomba), ajustado manualmente na própria bomba. Fixadas estas variáveis, a vazão fornecida pela bomba não é igual para todas as pressões de trabalho, assim, a curva de vazão deve ser construída para diferentes pressões.

Foram levantadas três curvas, para 150, 200 e 250 bar. Sendo que o *stroke* foi fixado em 15 cm e a frequência variada em 40, 60 e 80% de seu valor máximo. A variável medida foi a vazão de CO₂ em kg/h, a partir da diferença de massas medidas por uma balança colocada sob o cilindro do CO₂. Os testes foram efetuados com um leito de extração simulado com esferas de vidro até o volume total do vaso de extração. A vazão estabelecida para aplicação no trabalho foi de 4 kg/h, observando a mesma relação entre o volume do extrator e a taxa de dióxido de carbono reportada por Peng et al. (2006) que utilizaram um equipamento com vaso extrator com 10 L de capacidade. Outra referência a respeito, é o trabalho de Kotnik et al. (2007) que utilizaram um extrator de 4 L e taxa de dióxido de carbono de 13 kg/h, resultando numa relação entre a taxa e o volume do extrator de 3,25 kg/h por litro de capacidade da célula de extração. Os dados obtidos nestes testes de calibração são mostrados na Tabela 6. As curvas de vazão estão representadas na Figura 19.

TABELA 6: Vazão mássica de CO₂ a diferentes condições de bombeamento

<i>Frequência (%)</i>	<i>Vazão (kg/h)</i>		
	150 bar	200 bar	250 bar
40	3,28	2,48	2,00
60	4,24	3,68	2,72
80	6,40	5,92	4,56

A partir das curvas de calibração foi possível identificar o percentual de frequência para a vazão escolhida (dentro da faixa estudada) em cada pressão de operação.

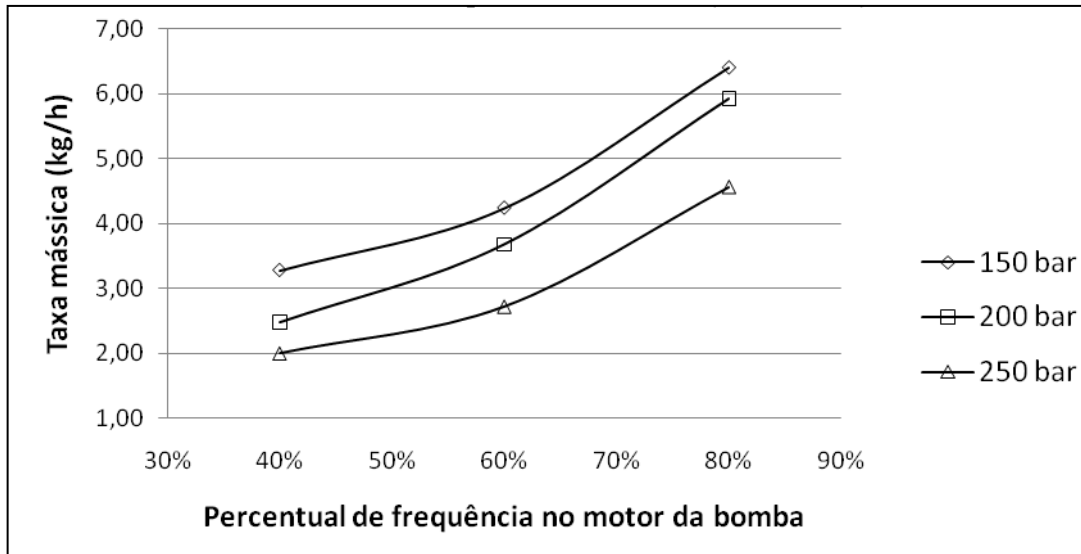


FIGURA 19: Curva de vazão de CO₂ a 150, 200 e 250 bar

2.3.2 Cossolvente

Os testes de calibração para a cabeça de cossolvente (B1.2) foram realizados com etanol. As vazões foram ajustadas para compreender de 1 a 5% da taxa mássica de CO₂ (4 kg/h). Entretanto, foram observadas variações de vazão de cossolvente, para variáveis fixas, durante os testes preliminares, sendo a pressão a de maior influência. Pequenas oscilações na pressão provocavam grandes variações de vazão, principalmente na pressão de 250 bar, onde a oscilação foi maior. Como o trabalho exige uma dosagem precisa de cossolvente, sua adição foi feita diretamente na célula de extração, sobre o material vegetal, antes do início da introdução de solvente.

3 Atividades preliminares

Antes de executar as corridas previstas pelo planejamento experimental, foram realizados experimentos com a polpa do butiá, explorando diferentes métodos de extração. O primeiro método foi a extração por soxhlet utilizando o etanol como solvente, os dois subsequentes métodos foram a EFS, executada a 200 bar, 50 °C e com 3% de dois diferentes cossolventes, etanol e água, respectivamente.

A extração por soxhlet possibilitou a obtenção de um extrato líquido. Da mesma forma, na EFS, em que se fez uso do etanol como cossolvente, coletou-se um extrato líquido após a válvula de expansão do CO₂. Já na EFS, em que se utiliza água como cossolvente, foi produzido um extrato sólido com aparência de uma cera, coletado posteriormente à válvula de expansão. A água acrescida como cossolvente permaneceu no interior da célula de extração, juntamente com a matriz vegetal, uma vez que a água apresenta baixa solubilidade no CO₂ supercrítico (TAYLOR, 1996). O extrato sólido que saiu da célula foi separado entre seus componentes (polar e apolar) para as análises cromatográficas. Esta separação foi feita adicionando ao extrato dois solventes de polaridades diferentes, promovendo, assim a separação. Foram adicionados, então, hexano, metanol e água. Torna-se necessária, a adição de água, para evitar a dissolução de metanol no hexano. A mistura obtida foi transferida para um funil de separação. Duas frações do extrato foram coletadas, uma apolar (fase hexano) e outra polar (fase metanol e água). A coleta do resíduo aquoso remanescente na célula de extração gerou uma terceira fração de extrato.

3.1 Análise qualitativa dos extratos de butiá

Os procedimentos exploratórios de extração, descritos anteriormente, geraram cinco diferentes extratos, analisados qualitativamente por cromatografia de camada delgada e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.1.1 Cromatografia de camada delgada

A cromatografia de camada delgada permite avaliar qualitativamente os extratos. O método faz uso de uma placa retangular de metal recoberta por uma fina camada de sílica. A uma distância de 1 cm da base da placa foram aplicados os cinco extratos (descritos anteriormente) e padrões de flavonóides disponíveis no Laboratório de Óleos Essenciais da Universidade de Caxias do Sul. Os extratos, bem como os padrões, foram aplicados cuidadosamente com tubos capilares de vidro em pontos afastados entre si a uma distância de cerca de 1 cm, ao longo da base da placa.

Uma solução contendo clorofórmio, ácido acético e água, na proporção de 10:9:1, respectivamente, foi preparada numa cuba de vidro num volume que permitiu um nível com cerca de 0,5 cm de altura. A placa cromatográfica foi, então, introduzida na cuba na posição vertical. Por capilaridade, a solução ascendeu pela placa, sendo esta removida da cuba antes da solução atingir seu topo. Ao subir pela placa, a solução carrega o material presente nas amostras da base, desprendendo os compostos ao longo do percurso, os quais ficam retidos em diferentes alturas da placa. Cada composto apresenta uma altura específica de retenção, sendo este fenômeno utilizado para a identificação dos compostos dos extratos. Na sequência a placa foi aspergida com os reveladores NP (2-aminoetil-difenil-borato) e PEG (polietilenoglicol) e submetida à luz de comprimento de onda de 365 nm (WAGNER e BLADT, 1995).

A Figura 20 mostra a cromatografia de camada delgada (CCD). Usando este método foram analisados os cinco diferentes extratos de butiá obtidos. Também foram analisados nove padrões de flavonóides e ácidos cinâmicos: rutina, ácido clorogênico, naringina, flavona, hesperidina, quercetina, canferol, apigenina e taxifolina.

Os extratos numerados como 1, 2 e 5 apresentaram pontos luminosos, a partir dos quais, foi possível sugerir a presença de rutina e ácido clorogênico. Quercetina e canferol

apresentaram pontos luminosos apenas no topo da placa, inviabilizando a identificação. Os demais padrões não apresentaram pontos luminosos, ou seja, não foram identificados por este método analítico.

A análise destes resultados preliminares indicou o etanol como a melhor escolha de cossolvente para as extrações em equipamento supercrítico. O motivo é a possibilidade da remoção do extrato, contendo os compostos fenólicos, do interior da célula de extração, o que não ocorre quando se utiliza água como cossolvente.

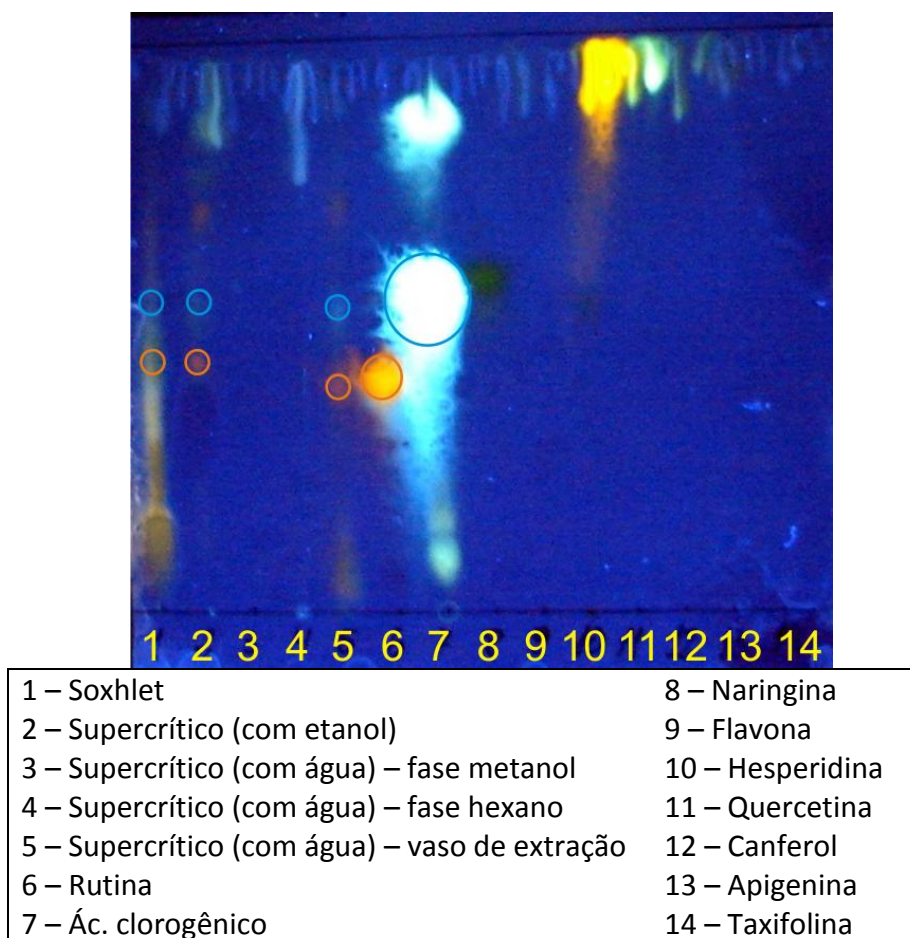


FIGURA 20: Cromatografia de camada delgada de amostras de diferentes extratos e padrões

3.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é baseada no transporte forçado da amostra a ser analisada, por uma fase móvel líquida, através de uma coluna. As diferenças nas interações entre os analitos e a superfície da coluna, resultam em diferentes tempos de

retenção para cada componente da mistura. A amostra é injetada no início da coluna e a fase móvel a carrega até o final. Ao percorrer a coluna, ocorre a separação dos compostos. No final da coluna encontra-se um detector que avalia cada composto efluente (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007). O resultado é um cromatograma formado por picos de diferentes áreas, distribuídos ao longo do tempo. Cada pico corresponde a um composto sendo sua área dependente da concentração deste composto. A metodologia utilizada para as análises está descrita no item 3.3.1.

Para a identificação de cada composto foi necessária a comparação com padrões, estes disponíveis no Laboratório de Óleos Essenciais da Universidade de Caxias do Sul (Tabela 7). O mesmo procedimento analítico aplicado aos extratos foi aplicado aos compostos padrões, tendo como critério de comparação o tempo de retenção de cada composto padrão, ou seja, a posição do pico no eixo do tempo, ilustrado no cromatograma.

TABELA 7: Compostos padrões utilizados nas análises

Classificação	Compostos	Marca
<i>Flavonóide</i>	naringina	Fluka®
	canferol	Sigma-Aldrich®
	taxifolina	Fluka®
	quercetina	Fluka®
	rutina	Merck & Co.
	apigenina	Sigma-Aldrich®
<i>Ácido cinâmico</i>	Ácido clorogênico	Sigma-Aldrich®
	ácido ferúlico	Tsuno Rice Fine Chemicals Co.
	ácido pirogálico	Vetec

A análise qualitativa por CLAE foi realizada somente com o extrato obtido no experimento exploratório, feito em equipamento supercrítico e utilizando o etanol como cossolvente. O cromatograma do extrato, gerado na CLAE, é mostrado na Figura 21. A comparação dos tempos de retenção dos compostos do extrato com cromatogramas provenientes das análises com os compostos padrões sugerem a presença, além dos compostos identificados na CCD (rutina e ácido clorogênico), de outros três compostos: o ácido ferúlico, a quercetina e o canferol. O ácido ferúlico não havia sido usado na CCD.

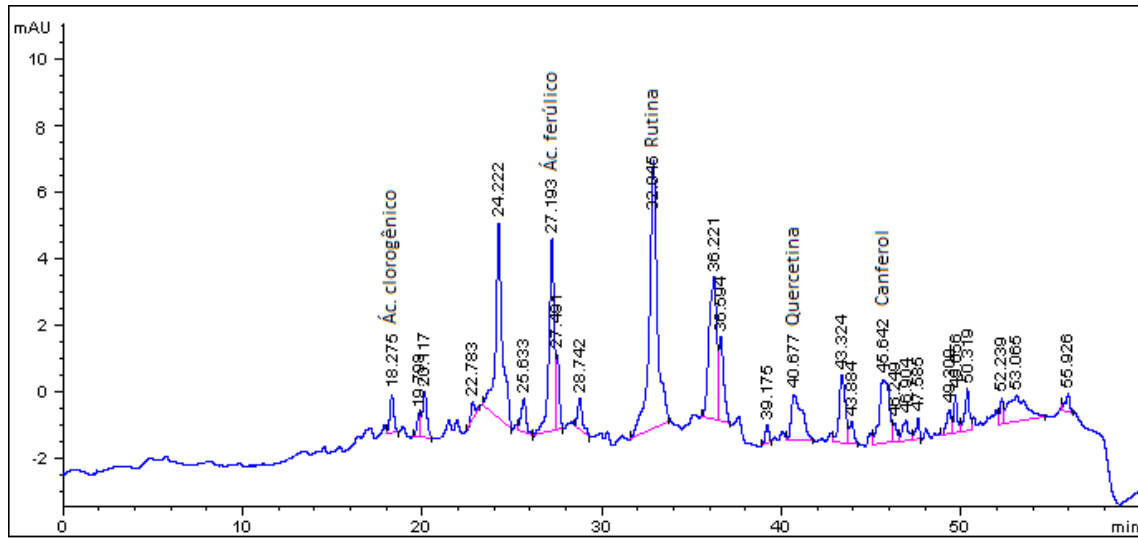


FIGURA 21: Cromatograma gerado por CLAE da amostra do extrato supercrítico

4 Materiais e métodos

4.1 Coleta e preparação do material vegetal

O material vegetal, compreendido pelos frutos de butiá da espécie *Butia capitata*, foi coletado no município de Barra do Ribeiro, no Estado do Rio Grande do Sul (Figura 36). Na imagem de satélite, no canto esquerdo superior da figura, observa-se uma região mais clara, sombreada por vários pontos verdes. Esses pontos representam as plantas de *Butia capitata*. Os exemplares encontram-se distribuídos próximos da região a 30°31' latitude Sul, 51°21' longitude Oeste.

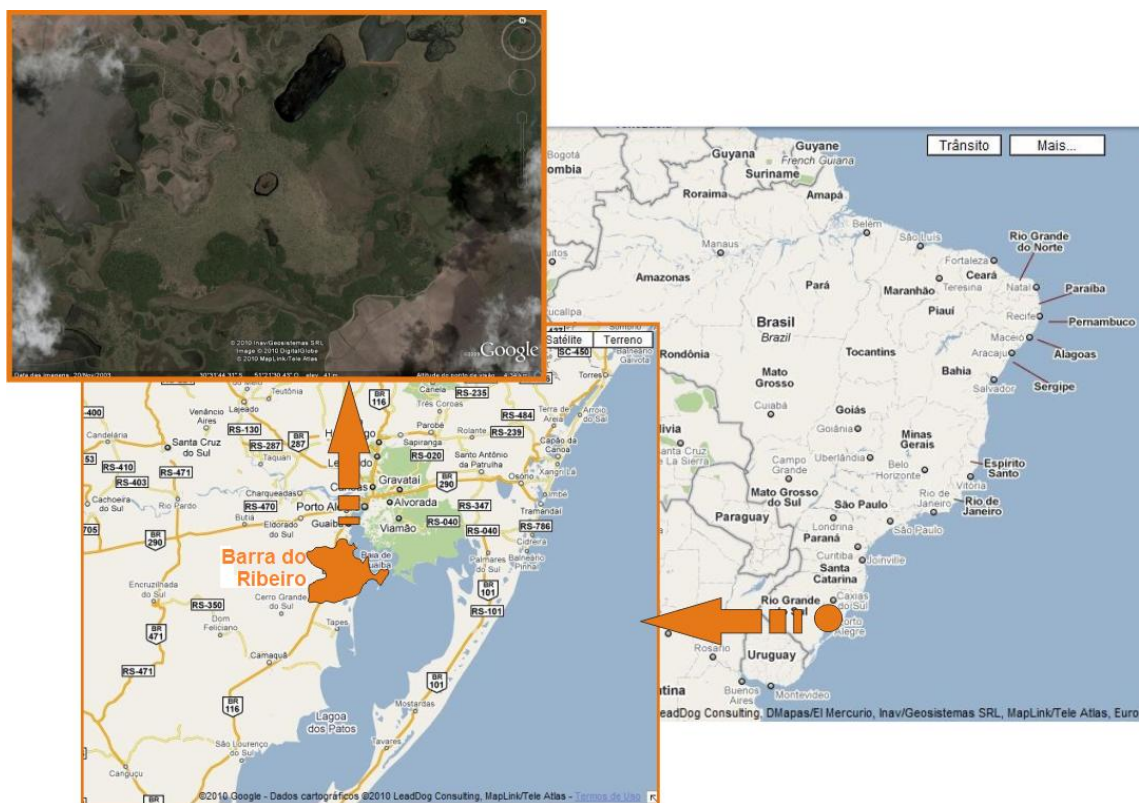


FIGURA 22: Localização do butiazal em Barra do Ribeiro/RS

Fonte: Google Earth™, 2009

4.1.1 Coleta

A coleta ocorreu no dia 29 de março de 2009. As plantas encontravam-se no final da frutificação, porém algumas ainda apresentavam frutos imaturos e inflorescências. A Figura 23 mostra alguns exemplares de *Butia capitata* encontrados na região de coleta dos frutos.



FIGURA 23: Exemplares de *Butia capitata* em Barra do Ribeiro/RS
Foto: Daniel Toss, 2009

Foram selecionadas 13 plantas, sendo coletado um cacho de cada exemplar no estágio médio de maturação (Figura 38), identificados pela coloração característica do fruto maduro. Esses cachos foram armazenados em embalagens individuais e transportados para o Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. Os frutos, então, foram separados da respectiva ráquis, lavados e mantidos sob refrigeração.



FIGURA 24: Cacho de frutos do butiá

Foto: Daniel Toss, 2009

4.1.2 Preparação das amostras

Para os experimentos foi utilizada apenas a polpa, para isto foi necessário separá-la, manualmente, do restante do fruto. A polpa do butiá foi desidratada num secador com circulação forçada de ar (Figura 39), a uma temperatura monitorada de 32°C, pelo período de oito dias e, após isso, mantida em embalagens de papel pardo.

Após a secagem a polpa dos 13 diferentes cachos foi misturada de forma homogênea.

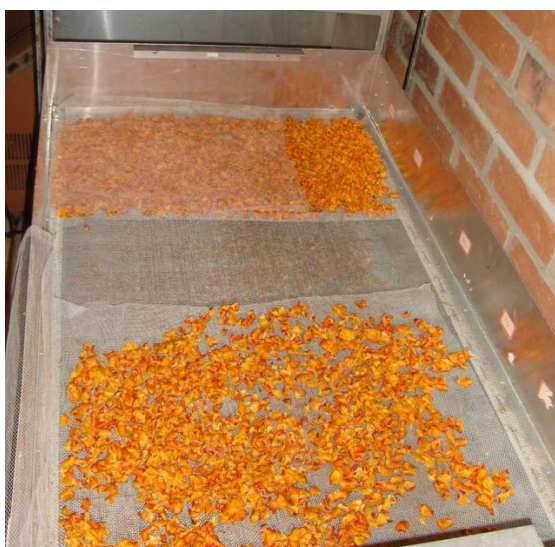


FIGURA 25: Secador com circulação forçada de ar utilizado na desidratação da polpa de butiá

Foto: Daniel Toss, 2009

4.1.3 Determinação do teor de umidade

Para a determinação do teor de umidade, presente nos frutos de butiá que sofreram desidratação, foi feito um teste utilizando uma balança determinadora de umidade da marca Ohaus®, modelo MB200.

4.2 Extração

As extrações foram realizadas em soxhlet e em equipamento de EFS. Em ambos os processos foi utilizada a polpa desidratada do butiá.

4.2.1 Extração em soxhlet

A extração em soxhlet utiliza solvente líquido para o isolamento dos compostos de interesse. O material vegetal permanece envolto por um papel filtro, no interior de um recipiente, chamado de extrator soxhlet, que é conectado imediatamente acima de um balão (Figura 40). O balão recebe o solvente de extração, escolhido de acordo com o composto a ser isolado. O volume a ser adicionado ao balão deve ser no mínimo duas vezes o volume do recipiente soxhlet. Mediante o calor fornecido por uma manta de aquecimento, o solvente evapora e é dirigido para um condensador, localizado acima do recipiente soxhlet. Já no estado líquido, o solvente goteja sobre o material vegetal, até completar o volume total do recipiente. Assim, o solvente é removido completamente por intermédio de um sifão e retorna, juntamente com o extrato, para o balão. No balão ocorre novamente a evaporação do solvente, formando, então, os estágios de extração.



FIGURA 26: Equipamento de soxhlet

Foto: Daniel Toss, 2010

Em cada extração em soxhlet, utilizaram-se 85 g de polpa de butiá desidratada, o solvente selecionado foi o etanol a 100% e o tempo de extração foi de 10 horas. O extrato obtido foi concentrado até o volume de 100 mL, com o auxílio do de equipamento rotavapor (marca ©-Fisatom, modelo 802D), que possibilita a evaporação do solvente à baixa pressão.

O objetivo da extração em soxhlet é criar um parâmetro base para a comparação do material extraído com o obtido na EFS, uma vez que é um processo com bom desempenho na obtenção de compostos fenólicos (CHIU et al., 2002; WILLIAMS et al., 2006).

4.2.2 Extração em equipamento supercrítico

As extrações com dióxido de carbono supercrítico foram realizadas no equipamento piloto, mostrado na Figura 27. O vaso de extração tem capacidade de 1 L e comportou 150 g de polpa de butiá desidratada. O aquecimento do vaso é efetuado por uma resistência térmica. O CO₂ (marca Air Products and Chemicals Inc., dióxido de carbono técnico) é fornecido, no estado líquido, por um cilindro, e pressurizado através de uma bomba de

diafragmas de alta pressão. A pressão no interior da célula de extração é mantida constante por uma válvula de controle, localizada imediatamente após o vaso. Na saída da válvula de controle o CO₂ está no estado gasoso, ocorrendo a separação dos extratos, que são coletados em frascos de vidros, mantidos em banho de resfriamento.



FIGURA 27: Equipamento de EFS

Foto: Daniel Toss, 2008

As variáveis avaliadas foram pressão, temperatura e teor de cossolvente (frente à massa total de solvente utilizado), ambas em três níveis (Tabela 8).

TABELA 8: Variáveis e respectivos níveis utilizados nos experimentos

	Nível baixo	Nível médio	Nível alto
<i>Temperatura, °C</i>	40	50	60
<i>Pressão, bar</i>	150	200	250
<i>Teor de cossolvente, %</i>	1	3	5

O tempo de extração foi de 1 h, seguindo o trabalho de Liza *et al.* (2010) e a taxa mássica de dióxido de carbono foi de 4 kg/h, como descrito nas atividades preliminares.

O cossolvente utilizado nos experimentos foi o etanol, escolhido por ser não-tóxico e mais solúvel no dióxido de carbono do que a água. Nos experimentos foram analisados os

níveis de 1, 3 e 5% em massa. O cálculo do teor de cossolvente (em % mássica) é baseado na massa total de solvente (dióxido de carbono somado ao cossolvente) utilizada durante a extração (equação 1).

$$\text{teor de coss.} = \frac{m_{\text{coss}}}{m_{\text{CO}_2} + m_{\text{coss}}} \times 100 \quad (1)$$

onde:

m_{coss} = massa de cossolvente adicionada na célula de extração;

m_{CO_2} = massa total de dióxido de carbono utilizada durante a extração (4 kg).

A Tabela 9 mostra as massas de cossolvente adicionadas em cada nível. A quantidade de etanol, mostrada na tabela, é adicionada diretamente no vaso de extração antes de iniciar o processo. Este procedimento foi definido, pois a cabeça responsável pelo bombeamento do cossolvente não fornece fluxo constante, ou seja, a quantidade de etanol bombeada não é precisa nas vazões estudadas.

TABELA 9: Quantidades de cossolvente adicionadas nas extrações

	Nível baixo, 1%	Nível médio, 3%	Nível alto, 5%
Massa de cossolvente, g	40,40	123,70	210,52

O planejamento experimental foi elaborado a partir das três variáveis em três níveis, com o modelo 3^3 , totalizando 27 experimentos (Tabela 10). O fluxo de CO_2 , bem como o tempo de extração, foram mantidos constantes.

4.3 Procedimentos analíticos

Dois procedimentos analíticos foram utilizados para a quantificação de flavonóides presentes nos extratos de butiá. A CLAE permitiu a quantificação de compostos isolados e com o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI, 1965) se obteve a quantidade total de compostos fenólicos.

TABELA 10: Planejamento experimental para a EFS

Corrida	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Teor de cossolvente (%)	Massa específica do CO ₂ (g/mL)
1	150	40	1	0,78
2	150	40	3	0,78
3	150	40	5	0,78
4	150	50	1	0,70
5	150	50	3	0,70
6	150	50	5	0,70
7	150	60	1	0,60
8	150	60	3	0,60
9	150	60	5	0,60
10	200	40	1	0,84
11	200	40	3	0,84
12	200	40	5	0,84
13	200	50	1	0,79
14	200	50	3	0,79
15	200	50	5	0,79
16	200	60	1	0,72
17	200	60	3	0,72
18	200	60	5	0,72
19	250	40	1	0,88
20	250	40	3	0,88
21	250	40	5	0,88
22	250	50	1	0,84
23	250	50	3	0,84
24	250	50	5	0,84
25	250	60	1	0,79
26	250	60	3	0,79
27	250	60	5	0,79

4.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises dos extratos foram efetuadas num equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da marca HP modelo 1100, coluna Lichrospher RP18 (5µm) equipado com detector UV a 350 nm e sistema quaternário de bombas. Na análise em fase reversa, utilizou-se um sistema binário de solventes, constituído por metanol e uma mistura de água/ácido acético (100/1 v/v). 50 µL das amostras foram injetados no equipamento de CLAE. O sistema de bombeamento da fase móvel foi gradiente, como mostra a Tabela 11. O tempo total de análise foi de 60 min, a temperatura foi mantida a 25°C e a vazão padrão foi mantida a 1 mL/min, de acordo com Cristea et al. (2003).

TABELA 11: Gradiente da fase móvel

Tempo (min)	início	25	40	50	55	60
MeOH (%)	5	40	60	90	90	5

Para a quantificação dos compostos, presentes nos extratos, foi necessária a elaboração de uma curva de calibração para cada composto identificado. Diferentes concentrações conhecidas dos compostos padrões foram injetadas, em triplicata, no cromatógrafo. Cada concentração está associada a uma área e, por regressão linear, é possível encontrar a relação entre a concentração do composto e a área do pico gerado.

A partir das curvas de calibração, foi possível quantificar alguns extratos obtidos, sendo os resultados expressos em mg do composto/100g de PBD (polpa de butiá desidratada).

4.3.1.1 Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais (CFT) foram determinados de acordo com o método Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). Uma parcela de 1,0 mL das amostras foi transferida para tubos de ensaio, em seguida foi acrescentado o reagente Folin-Ciocalteu (1,0 mL) e 0,8 mL de uma solução de carbonato de sódio (7,5% p/v). Os tubos foram agitados, deixados repousar por 30 min ao abrigo da luz. Por intermédio do espectrofotômetro *Pró-análise UV – 1600 Spectrophotometer* foi medida a absorvância no comprimento de onda de 765 nm. Rutina foi empregada como padrão para a curva de calibração. A curva foi elaborada seguindo o mesmo método. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Os resultados foram expressos como rutina equivalente (mg RE/100 g de PBD).

4.3.2 Teste estatístico

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA). ANOVA é um método estatístico utilizado para interpretar dados experimentais e tomar decisões sobre as variáveis estudadas (ROSS, 1996). O teste permite avaliar a influência das variáveis e de interações entre elas. O valor observado (F_o), fornecido

pelo teste estatístico, é comparado com o valor crítico (F_c), obtido de Montgomery (1997) para níveis de confiança de 95 e 99%. Considera-se que houve influência de uma dada variável quando F_o for maior que F_c e quanto mais este se afasta de F_c mais expressiva é a relevância da variável ou interação analisada.

4.3.3 Determinação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo ensaio *in vitro* da varredura do radical DPPH•, seguindo o método descrito por Yamaguchi et al. (1998) com algumas modificações. Os extratos obtidos nas corridas 15 e 27, e o extrato em soxhlet passaram, inicialmente, por rotavapor, com a finalidade da remoção completa do solvente (etanol), resultando num extrato sólido. Este extrato sólido voltou, então, a ser diluído com dois diferentes solventes: etanol (no caso do extrato em soxhlet) e dimetilsulfóxido (no caso dos extratos obtidos em EFS), nas razões de 3,125 a 100 mg de extrato sólido/mL de solvente.

Em tubos de ensaio foi acrescentada uma solução tampão de tris-HCl (100 mM, pH 7,0), em seguida uma alíquota dos extratos nas diferentes concentrações e, por fim, a solução etanólica contendo os radicais DPPH• (250 μ M). Os tubos foram mantidos em repouso por 20 min ao abrigo da luz e, em seguida, a absorbância medida no comprimento de onda de 517 nm. Etanol foi utilizado para o ajuste do zero.

O mesmo procedimento foi repetido, porém utilizando, em substituição aos extratos, etanol, que serviu como base para a comparação com os extratos (solução padrão). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para o cálculo da atividade antioxidante (% varredura do radical DPPH•) foi utilizada a equação (2). Os resultados da atividade antioxidante foram relacionados linearmente com a respectiva concentração, o que possibilitou calcular a concentração de extrato necessária pra varrer 50% do radical DPPH• (IC_{50}).

$$\% \text{ de redução de DPPH} \cdot = \frac{ABS_{padr\tilde{a}o} - ABS_{amostra}}{ABS_{padr\tilde{a}o}} \times 100 \quad (2)$$

onde:

$ABS_{padr\tilde{a}o}$ = absorbância da solução padrão;

$ABS_{amostra}$ = absorbância das amostras.

5 Resultados e discussão

5.1 Preparação das amostras

A remoção manual e a desidratação da polpa do butiá geraram partículas laminares, no formato de semi-casca de esferas. Uma caracterização feita com um paquímetro permitiu medir as partículas. A espessura média das partículas foi de 1 mm, sendo o comprimento e a largura com cerca de 15 mm e 20 mm, respectivamente.

O processo de desidratação e armazenamento pode provocar a oxidação dos compostos fenólicos, presentes na polpa do butiá. Uma manifestação desta oxidação é o escurecimento da polpa, observada durante o período do armazenamento.

O excesso de umidade, em matérias-primas vegetais, permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação dos constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias. O teor de umidade estabelecido nas diferentes farmacopéias varia entre 8 e 14% (FARIAS , 2001). Após a desidratação, foi medida a umidade contida na polpa do butiá. O teste revelou que os frutos desidratados apresentaram 14,3% de umidade, valor este superior em 0,3 pontos percentuais ao encontrado na literatura. Além disso, foi calculada a umidade perdida durante o processo de secagem. Em média a polpa perdeu 81,72% de umidade.

5.2 Análise quantitativa

Uma vez identificados os compostos pelos procedimentos qualitativos, os extratos provenientes do planejamento experimental, bem como o da extração em soxhlet, foram analisados quantitativamente por CLAE e pelo método Folin-Ciocalteu. A quantificação por CLAE dos flavonóides foi realizada a partir da curva de calibração

para cada composto (Figura 42). Foi encontrada, para cada composto, uma correlação linear entre a área do pico gerado nos cromatogramas na CLAE e a concentração do composto.

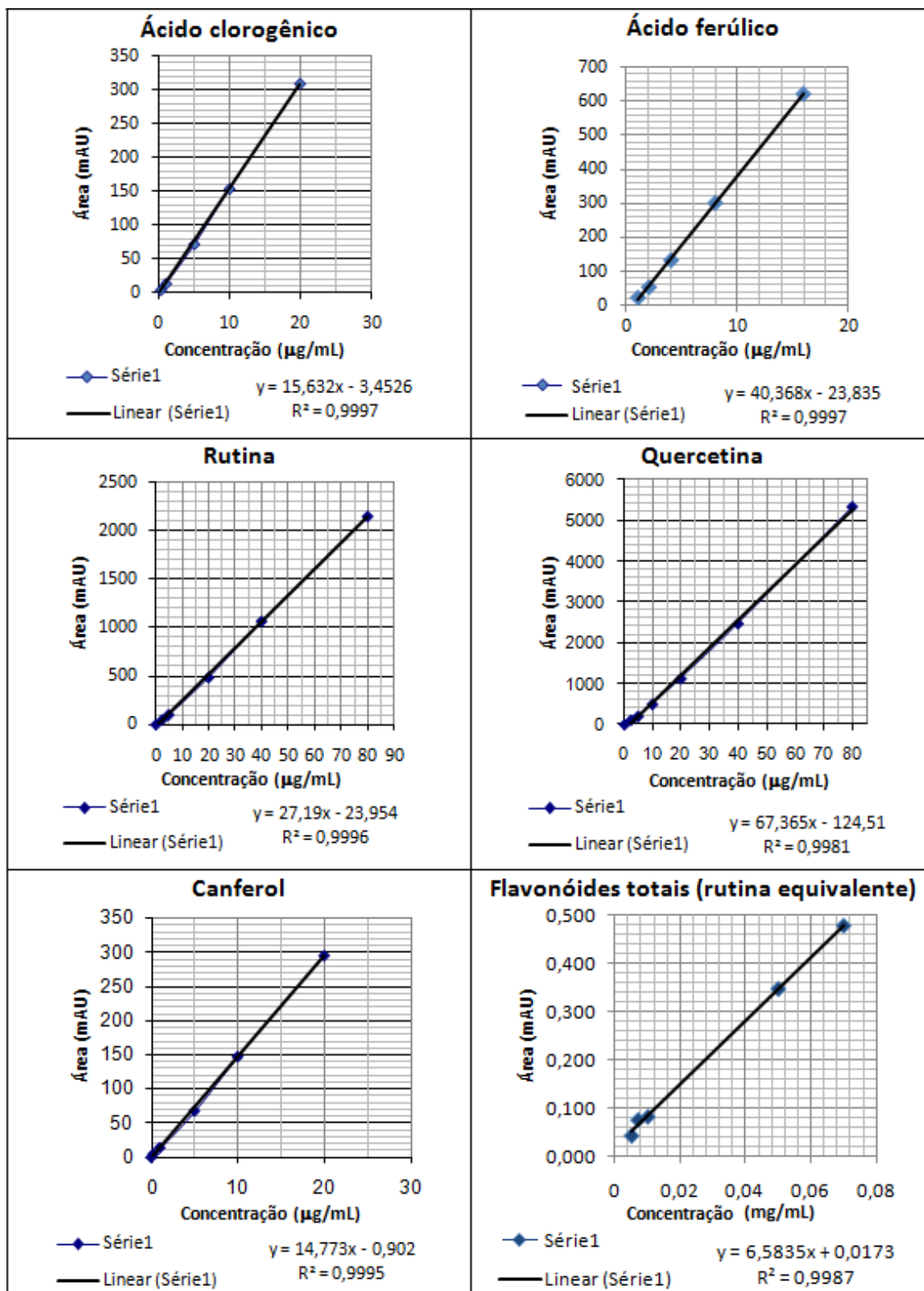


FIGURA 28: Curva de calibração para os diferentes compostos

5.2.1 Ácido clorogênico

A Tabela 12 mostra os rendimentos em ácido clorogênico nos extratos obtidos nos experimentos. As análises cromatográficas, feitas nos extratos supercríticos com 1% de cossolvente, não indicaram a presença de ácido clorogênico. A extração por soxhlet apresentou um rendimento de 5,08 mg de ácido clorogênico/100g PBD. Os experimentos de número 18 e 27, com fluido supercrítico, apresentaram os maiores rendimentos (0,36 e 0,46 mg de ácido clorogênico/100 g PBD, respectivamente).

TABELA 12: Rendimentos em ácido clorogênico

Corrida	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Teor de coss. (%)	Rendimentos (mg/100g PBD)
Soxhlet	-	-	-	5,08
1	150	40	1	ni*
2	150	40	3	0,22
3	150	40	5	0,27
4	150	50	1	ni
5	150	50	3	0,15
6	150	50	5	0,30
7	150	60	1	ni
8	150	60	3	0,14
9	150	60	5	0,26
10	200	40	1	ni
11	200	40	3	0,09
12	200	40	5	0,17
13	200	50	1	ni
14	200	50	3	0,11
15	200	50	5	0,30
16	200	60	1	ni
17	200	60	3	0,19
18	200	60	5	0,36
19	250	40	1	ni
20	250	40	3	0,20
21	250	40	5	0,24
22	250	50	1	ni
23	250	50	3	0,16
24	250	50	5	0,26
25	250	60	1	ni
26	250	60	3	0,16
27	250	60	5	0,46

*não identificado por CLAE

A Figura 29 ilustra o comportamento dos rendimentos em ácido clorogênico como função da temperatura, nas diferentes pressões.

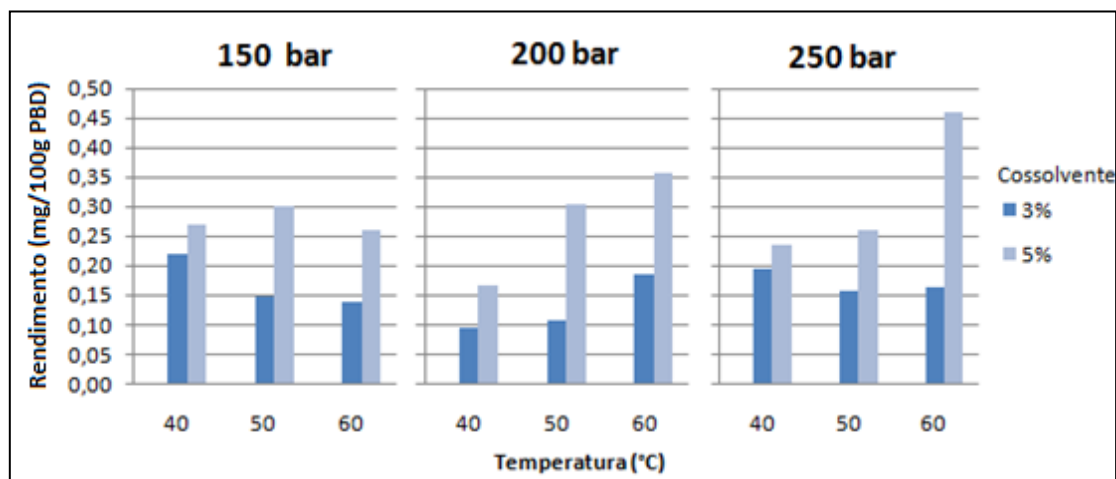


FIGURA 29: Comportamento dos rendimentos em ácido clorogênico como função da temperatura, nas diferentes pressões e diferentes concentrações de cossolvente

A Tabela 13 mostra os resultados da ANOVA para os rendimentos em ácido clorogênico. A única variável expressiva, com nível de confiança de até 99%, foi o teor de cossolvente. As demais variáveis e interações não demonstram influência, nos níveis de confiança analisados.

TABELA 13: ANOVA para os rendimentos em ácido clorogênico

<i>Variáveis</i>	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrada	Fo	Fc, $\alpha=0,05$	Fc, $\alpha=0,01$
<i>Temperatura</i>	0,0086	2	0,0043	2,1120	4,46	8,65
<i>Pressão</i>	0,0038	2	0,0019	0,9306	4,46	8,65
<i>Teor de cossolv.</i>	0,3811	2	0,1905	93,0589	4,46	8,65
<i>Temp-pres</i>	0,0147	4	0,0037	1,7889	3,84	7,01
<i>Temp-teor</i>	0,0202	4	0,0050	2,4647	3,84	7,01
<i>Pres-teor</i>	0,0034	4	0,0009	0,4161	3,84	7,01
<i>Erro</i>	0,0164	8	0,0020			
<i>Total</i>	0,4482	26				

5.2.2 Ácido ferúlico

A Tabela 14 mostra os rendimentos em ácido ferúlico obtidos nos extratos. As análises cromatográficas, feitas a partir dos extratos supercríticos a 150 bar e 40°C,

não indicaram a presença de ácido ferúlico. A extração por soxhlet apresentou um rendimento de 5,44 mg de ácido ferúlico/100g PBD. Os experimentos de número 26 e 27, com fluido supercrítico, apresentaram os maiores rendimentos (1,27 e 1,45 mg de ácido ferúlico/100 g PBD, respectivamente).

TABELA 14: Rendimentos em ácido ferúlico

Corrida	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Teor de coss. (%)	Rendimentos (mg/100g PBD)
Soxhlet	-	-	-	5,44
1	150	40	1	ni*
2	150	40	3	ni
3	150	40	5	ni
4	150	50	1	0,37
5	150	50	3	0,50
6	150	50	5	0,59
7	150	60	1	0,37
8	150	60	3	0,48
9	150	60	5	0,57
10	200	40	1	0,39
11	200	40	3	0,39
12	200	40	5	0,45
13	200	50	1	0,48
14	200	50	3	0,46
15	200	50	5	0,69
16	200	60	1	0,56
17	200	60	3	0,61
18	200	60	5	0,81
19	250	40	1	0,54
20	250	40	3	0,86
21	250	40	5	0,42
22	250	50	1	0,47
23	250	50	3	0,57
24	250	50	5	0,51
25	250	60	1	0,59
26	250	60	3	1,27
27	250	60	5	1,45

*não identificado por CLAE

A Figura 30 ilustra o comportamento dos rendimentos em ácido ferúlico como função da temperatura, nas diferentes pressões.

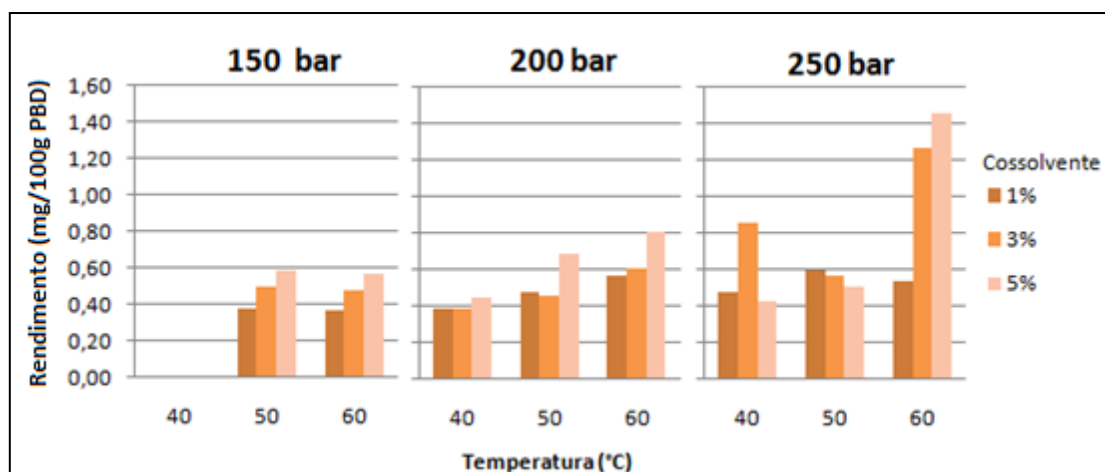


FIGURA 30: Comportamento dos rendimentos em ácido ferúlico como função da temperatura, nas diferentes pressões e diferentes concentrações de cossolvente

A Tabela 15 mostra os resultados da ANOVA para os rendimentos em ácido ferúlico. Da observação da tabela, pode-se dizer (com nível de confiança de até 99%) que a pressão e a temperatura apresentam maior influência nos rendimentos. Com menor influência encontram-se o teor de cossolvente e a interação entre a temperatura e a pressão, com nível de confiança de 95%. Os resultados para as demais variáveis e interações não demonstram sua influência nos rendimentos, nos níveis de confiança analisados.

TABELA 15: ANOVA para os rendimentos em ácido ferúlico

<i>Variáveis</i>	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrada	Fo	Fc, $\alpha=0,05$	Fc, $\alpha=0,01$
<i>Temperatura</i>	0,7481	2	0,3741	18,7766	4,46	8,65
<i>Pressão</i>	0,8094	2	0,4047	20,3151	4,46	8,65
<i>Teor de cossolv.</i>	0,1805	2	0,0902	4,5292	4,46	8,65
<i>Temp-pres</i>	0,4074	4	0,1019	5,1131	3,84	7,01
<i>Temp-teor</i>	0,1733	4	0,0433	2,1753	3,84	7,01
<i>Pres-teor</i>	0,1151	4	0,0288	1,4439	3,84	7,01
<i>Erro</i>	0,1594	8	0,0199			
<i>Total</i>	2,5932	26				

5.2.3 Rutina

A Tabela 16 mostra os rendimentos em rutina nos extratos obtidos nos experimentos. As análises cromatográficas, feitas nos extratos supercríticos a 150 bar e 40°C, 150 bar, 50°C e 1% de cossolvente e a 150 bar, 60°C e 1% de cossolvente, não indicaram a presença de rutina. A extração por soxhlet apresentou um rendimento de

81,23 mg de rutina/100g PBD. Os extratos dos experimentos de número 6 e 27, com fluido supercrítico, apresentaram os maiores rendimentos (2,42 e 3,47 mg de rutina/100 g PBD, respectivamente).

TABELA 16: Rendimentos em rutina obtidos nos experimentos

Corrida	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Teor de coss. (%)	Rendimentos (mg/100g PBD)
Soxhlet	-	-	-	81,23
1	150	40	1	ni*
2	150	40	3	ni
3	150	40	5	ni
4	150	50	1	ni
5	150	50	3	0,65
6	150	50	5	2,42
7	150	60	1	ni
8	150	60	3	0,55
9	150	60	5	1,56
10	200	40	1	0,25
11	200	40	3	0,49
12	200	40	5	0,79
13	200	50	1	0,19
14	200	50	3	0,62
15	200	50	5	1,89
16	200	60	1	0,08
17	200	60	3	0,73
18	200	60	5	2,08
19	250	40	1	ni
20	250	40	3	0,90
21	250	40	5	1,03
22	250	50	1	0,15
23	250	50	3	0,86
24	250	50	5	1,77
25	250	60	1	0,10
26	250	60	3	1,04
27	250	60	5	3,47

*não identificado por CLAE

A Figura 31 ilustra o comportamento dos rendimentos em rutina como função da temperatura, nas diferentes pressões.

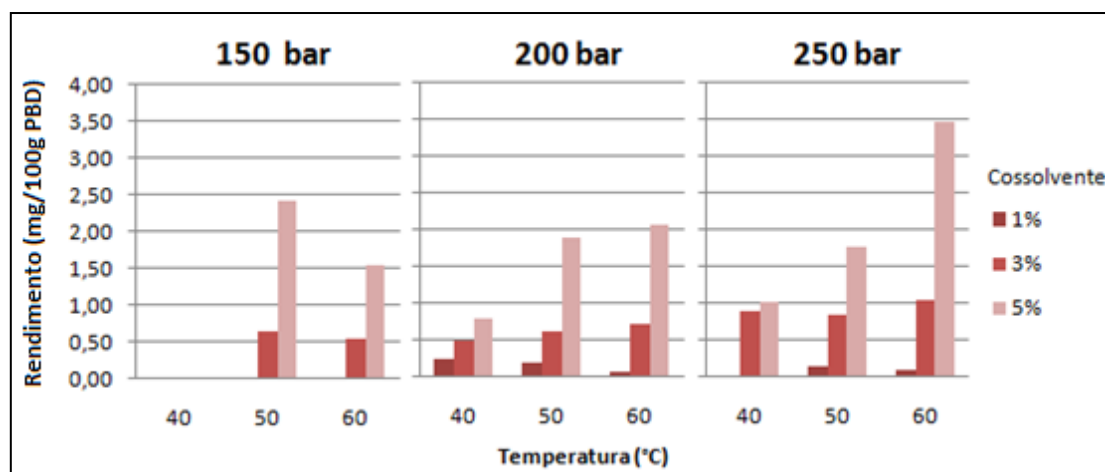


FIGURA 31: Comportamento dos rendimentos em rotina como função da temperatura, nas diferentes pressões e diferentes concentrações de cossolvente

A Tabela 17 mostra os resultados da ANOVA para os rendimentos em rotina. Da observação da tabela, pode-se dizer (com nível de confiança de até 99%) que o teor de cossolvente apresenta maior influência nos rendimentos. Com menor influência encontram-se a temperatura e a interação entre a temperatura e teor de cossolvente, com nível de confiança de 95%. Os valores de F_o das demais variáveis e interações não demonstram sua influência, nos níveis de confiança estudados.

TABELA 17: ANOVA para os rendimentos em rotina

<i>Variáveis</i>	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrada	F_o	$F_c, \alpha=0,05$	$F_c, \alpha=0,01$
<i>Temperatura</i>	2,4056	2	1,2028	8,2147	4,46	8,65
<i>Pressão</i>	0,9562	2	0,4781	3,2653	4,46	8,65
<i>Teor de cossolv.</i>	11,5573	2	5,7787	39,4659	4,46	8,65
<i>Temp-pres</i>	0,8565	4	0,2141	1,4624	3,84	7,01
<i>Temp-teor</i>	2,9972	4	0,7493	5,1174	3,84	7,01
<i>Pres-teor</i>	0,4285	4	0,1071	0,7317	3,84	7,01
<i>Erro</i>	1,1714	8	0,1464			
<i>Total</i>	20,3727	26				

5.2.4 Quercetina

A Tabela 18 mostra os rendimentos em quercetina nos extratos obtidos nos experimentos. As análises cromatográficas, feitas a partir dos extratos supercríticos a 150 bar e 40°C e nas condições de 150 bar, 50°C e 1% de cossolvente não indicaram a presença de quercetina. A extração por soxhlet apresentou um rendimento de 4,60 mg de quercetina/100g PBD. Os experimentos de número 15, 18 e 27, com fluido

supercrítico, apresentaram os maiores rendimentos (0,8, 0,8 e 0,9 mg de quercetina/100 g PBD, respectivamente).

TABELA 18: Rendimentos em quercetina obtidos nos experimentos

Corrida	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Teor de coss. (%)	Rendimentos (mg/100g PBD)
Soxhlet	-	-	-	4,60
1	150	40	1	ni*
2	150	40	3	ni
3	150	40	5	ni
4	150	50	1	ni
5	150	50	3	0,41
6	150	50	5	0,75
7	150	60	1	0,20
8	150	60	3	0,46
9	150	60	5	0,73
10	200	40	1	0,34
11	200	40	3	0,40
12	200	40	5	0,73
13	200	50	1	0,34
14	200	50	3	0,43
15	200	50	5	0,80
16	200	60	1	0,19
17	200	60	3	0,73
18	200	60	5	0,80
19	250	40	1	0,34
20	250	40	3	0,76
21	250	40	5	0,75
22	250	50	1	0,19
23	250	50	3	0,50
24	250	50	5	0,75
25	250	60	1	0,20
26	250	60	3	0,55
27	250	60	5	0,90

*não identificado por CLAE

A Figura 32 ilustra o comportamento dos rendimentos em quercetina nos extratos como função da temperatura, nas diferentes pressões.

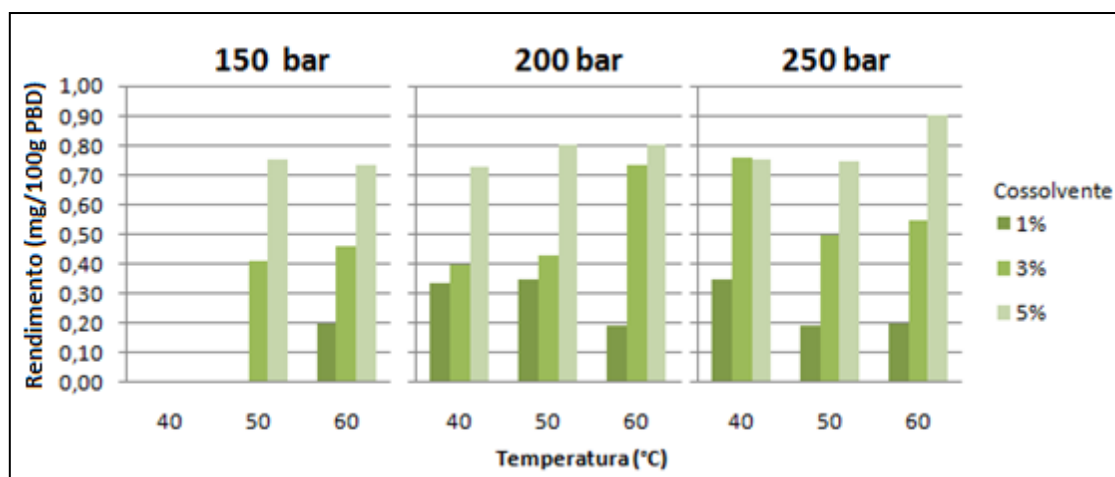


FIGURA 32: Comportamento dos rendimentos em quercetina como função da temperatura, nas diferentes pressões e diferentes concentrações de cossolvente

A Tabela 19 mostra os resultados da ANOVA para os rendimentos em quercetina. Pela observação da tabela, pode-se dizer (com nível de confiança de até 99%) que o teor de cossolvente e a pressão apresentam maior influência nos rendimentos. Com menor influência encontra-se a interação entre a temperatura e pressão, com nível de confiança de 95%. A variável temperatura e as demais interações não demonstram influência, nos níveis de confiança estudados.

TABELA 19: ANOVA para os rendimentos em quercetina

<i>Variáveis</i>	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrada	Fo	Fc, $\alpha=0,05$	Fc, $\alpha=0,01$
<i>Temperatura</i>	0,1175	2	0,0588	3,3049	4,46	8,65
<i>Pressão</i>	0,3943	2	0,1971	11,0867	4,46	8,65
<i>Teor de cossolv.</i>	1,0913	2	0,5456	30,6853	4,46	8,65
<i>Temp-pres</i>	0,2933	4	0,0733	4,1238	3,84	7,01
<i>Temp-teor</i>	0,1243	4	0,0311	1,7475	3,84	7,01
<i>Pres-teor</i>	0,0218	4	0,0054	0,3061	3,84	7,01
<i>Erro</i>	0,1423	8	0,0178			
<i>Total</i>	2,1847	26				

5.2.5 Canferol

A Tabela 20 mostra os rendimentos em canferol nos extratos obtidos nos experimentos. A extração por soxhlet apresentou um rendimento de 5,43 mg de canferol/100g PBD. Os experimentos de número 18 e 27, com fluido supercrítico, apresentaram os maiores rendimentos (1,36 e 1,93 mg de canferol/100 g PBD, respectivamente).

TABELA 20: Rendimentos em canferol obtidos nos experimentos

Corrida	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Teor de coss. (%)	Rendimentos (mg/100g PBD)
Soxhlet	-	-	-	5,43
1	150	40	1	0,05
2	150	40	3	0,04
3	150	40	5	0,04
4	150	50	1	0,19
5	150	50	3	0,71
6	150	50	5	0,91
7	150	60	1	0,13
8	150	60	3	0,56
9	150	60	5	0,74
10	200	40	1	0,39
11	200	40	3	0,86
12	200	40	5	1,06
13	200	50	1	0,27
14	200	50	3	0,95
15	200	50	5	1,02
16	200	60	1	0,28
17	200	60	3	0,73
18	200	60	5	1,36
19	250	40	1	0,43
20	250	40	3	0,93
21	250	40	5	0,77
22	250	50	1	0,39
23	250	50	3	0,84
24	250	50	5	0,90
25	250	60	1	0,42
26	250	60	3	1,26
27	250	60	5	1,93

A Figura 33 ilustra o comportamento dos rendimentos em canferol como função da temperatura, nas diferentes pressões.

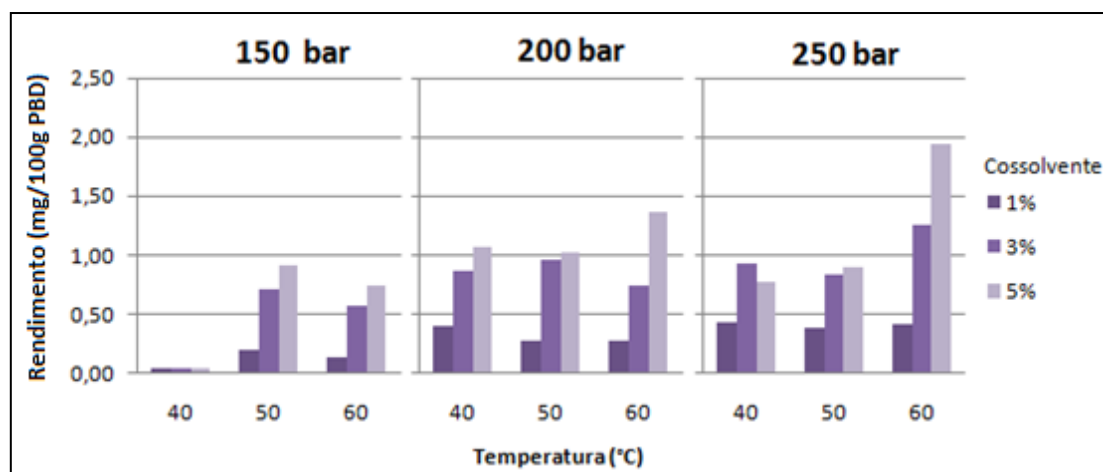


FIGURA 33: Comportamento dos rendimentos em canferol como função da temperatura, nas diferentes pressões e diferentes concentrações de cossolvente

A Tabela 21 mostra os resultados da ANOVA para os rendimentos em canferol. Da observação da tabela, pode-se dizer (com nível de confiança de até 99%) que o teor de cossolvente e a pressão apresentam maior influência nos rendimentos. Com menor influência encontra-se a temperatura e a interação entre a temperatura e pressão, com nível de confiança de 95%. As demais variáveis e interações não demonstram influência, nos níveis de confiança estudados.

TABELA 21: ANOVA para os rendimentos em canferol

<i>Variáveis</i>	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrada	Fo	Fc, $\alpha=0,05$	Fc, $\alpha=0,01$
<i>Temperatura</i>	0,4487	2	0,2244	7,2896	4,46	8,65
<i>Pressão</i>	1,2518	2	0,6259	20,3339	4,46	8,65
<i>Teor de cossolv.</i>	2,2446	2	1,1223	36,4619	4,46	8,65
<i>Temp-pres</i>	0,5615	4	0,1404	4,5608	3,84	7,01
<i>Temp-teor</i>	0,4375	4	0,1094	3,5535	3,84	7,01
<i>Pres-teor</i>	0,1513	4	0,0378	1,2289	3,84	7,01
<i>Erro</i>	0,2462	8	0,0308			
<i>Total</i>	5,3417	26				

5.2.6 Compostos fenólicos totais (CFT)

A Tabela 22 mostra os rendimentos em CFT obtidos nos experimentos. A extração por soxhlet apresentou um rendimento de 222,63 mg de rutina equivalente (RE)/100g de PBD. Os experimentos de número 6, 15 e 18, com fluido supercrítico, apresentaram os maiores rendimentos (24,42, 27,57 e 23,09 mg RE/100 g PBD, respectivamente).

TABELA 22: Rendimentos em CFT obtidos nos experimentos

Corrida	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Teor de coss. (%)	Rendimento (mg RE/100g PBD)
Soxhlet	-	-	-	222,63
1	150	40	1	3,27
2	150	40	3	13,35
3	150	40	5	12,27
4	150	50	1	3,12
5	150	50	3	11,28
6	150	50	5	24,42
7	150	60	1	3,27
8	150	60	3	12,88
9	150	60	5	17,74
10	200	40	1	10,07
11	200	40	3	13,80
12	200	40	5	14,09
13	200	50	1	12,40
14	200	50	3	13,78
15	200	50	5	27,57
16	200	60	1	7,11
17	200	60	3	11,61
18	200	60	5	23,09
19	250	40	1	6,09
20	250	40	3	9,33
21	250	40	5	18,72
22	250	50	1	3,96
23	250	50	3	14,15
24	250	50	5	12,64
25	250	60	1	4,00
26	250	60	3	17,70
27	250	60	5	19,24

A Figura 34 ilustra o comportamento dos rendimentos em CFT como função da temperatura, nas diferentes pressões. Pela análise dos rendimentos ilustrados no gráfico observa-se a influência do teor de cossolvente. Por outro lado, os níveis intermediários de temperatura e pressão forneceram os maiores rendimentos em CFT.

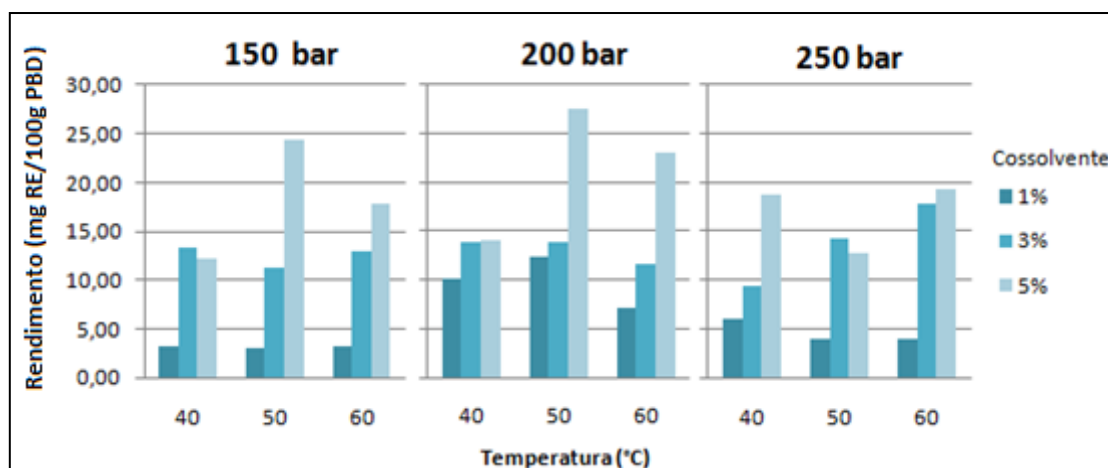


FIGURA 34: Comportamento dos rendimentos em CFT como função da temperatura, nas diferentes pressões e diferentes concentrações de cossolvente

A Tabela 23 mostra a ANOVA para os rendimentos em CFT. Pela observação da tabela, pode-se dizer (com nível de confiança de até 99%) que o teor de cossolvente apresentou maior influência nos rendimentos. Com menor influência encontra-se a temperatura e a interação entre a temperatura e teor de cossolvente, com nível de confiança de 95%. As demais variáveis e interações não demonstraram influência, nos níveis de confiança estudados.

TABELA 23: ANOVA para os rendimentos em CFT

<i>Variáveis</i>	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrada	Fo	Fc, $\alpha=0,05$	Fc, $\alpha=0,01$
<i>Temperatura</i>	2,4056	2	1,2028	8,2147	4,46	8,65
<i>Pressão</i>	0,9562	2	0,4781	3,2653	4,46	8,65
<i>Teor de cossolv.</i>	11,5573	2	5,7787	39,4659	4,46	8,65
<i>Temp-pres</i>	0,8565	4	0,2141	1,4624	3,84	7,01
<i>Temp-teor</i>	2,9972	4	0,7493	5,1174	3,84	7,01
<i>Pres-teor</i>	0,4285	4	0,1071	0,7317	3,84	7,01
<i>Erro</i>	1,1714	8	0,1464			
<i>Total</i>	20,3727	26				

Para fins de comparação entre os dados de literatura com o presente trabalho, toma-se a referência de Faria et al. (2008), que realizaram extrações etanólicas da polpa fresca dos frutos do butiá. Os autores encontraram teores entre 163 a 259 mg catequina equivalente/100 g de polpa fresca e entre 78 e 166 mg de ácido tânico equivalente/100 g de polpa fresca. Como, neste trabalho, o material vegetal foi desidratado, uma comparação só pode ser feita se levado em conta o teor

de umidade perdida durante a secagem. Assim, o rendimento obtido na extração em soxhlet, convertido para base úmida, torna-se 40,70 mg de RE/100 g de polpa fresca. E o rendimento obtido na corrida de número 15 (melhores condições na EFS) é representado, em base úmida, como sendo 5,04 mg de RE/100 g de polpa fresca. Os valores encontrados neste trabalho ficam abaixo dos reportados pela literatura, porém vale lembrar que não foi utilizado mesmo material vegetal, nem utilizada a mesma metodologia de preparo das amostras e de extração.

Quando se compara com outros trabalhos de extração de compostos fenólicos utilizando a EFS, destaca-se o trabalho de Bimakr et al. (2010), os autores, da mesma forma deste trabalho, identificaram compostos fenólicos isoladamente. O composto em comum identificado foi a rutina, num rendimento de 0,90 mg/100 g de folhas de menta desidratadas. O presente trabalho possibilitou um rendimento, utilizando a EFS, de 3,47 mg de rutina/100 g de PBD.

Em termos de compostos fenólicos totais ou de flavonóides totais, obtidos por EFS, compara-se este trabalho (27,57 mg de RE/100 g de PBD) com referências encontradas na literatura. As semelhanças observadas estão nas condições de extração que maximizaram os rendimentos. Em algumas referências, como é o caso de Wang et al. (2008) e Liza et al. (2010), foram encontradas mesma pressão (200 bar) e mesma temperatura (50°C) como melhores condições de extração.

5.2.7 Efeito do teor do cossolvente

Com relação ao efeito do teor de cossolvente utilizado, a modificação da polaridade do meio proporcionada pelo etanol fez com que houvesse um incremento de solubilidade que foi tanto maior quanto maior o teor de etanol adicionado ao sistema. Isto fez com que os rendimentos em flavonóides fossem, de forma geral, diretamente proporcionais ao teor de cossolvente, mantidas as outras condições fixas. Esses resultados estão de acordo com Lucien e Foster (2000), os quais reportam que a adição de um modificador de polaridade junto ao CO₂ favorece a extração de compostos polares, tais como os flavonóides.

5.2.8 Efeito da temperatura e da pressão

A massa específica de um fluido supercrítico está diretamente relacionada com sua pressão. Incrementos na pressão (uma vez fixada a temperatura) provocam incrementos na massa específica e, por consequência, elevação do poder de extração. A faixa de massa específica estudada neste trabalho varia de 0,62 g/mL (60°C e 150 bar) a 0,88 g/mL (40°C e 250 bar). Espera-se que no valor mais elevado de massa específica os rendimentos sejam superiores, porém outra influência é observada na temperatura. Embora incrementos de temperatura (mantida a pressão) provoquem a redução da massa específica do CO₂, ao mesmo tempo a pressão de vapor dos solutos é aumentada. A elevação da pressão de vapor de um soluto facilita a passagem dos solutos para a fase supercrítica (Liza et al. 2010). A associação de influências da pressão e da temperatura provoca o fenômeno *crossover*, que ocorre no momento em que a pressão deixa de ser a variável mais importante nos rendimentos e dá lugar à temperatura (MELO et al., 2009; MACHMUDAH et al., 2008 e COMIM et al., 2010).

5.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi testada pela varredura do radical DPPH•. O resultado do teste é ilustrado pela Figura 35. A partir da relação linear entre a concentração de extrato e a atividade antioxidante, foi possível calcular o IC₅₀ (concentração de extrato necessária pra varrer 50% do radical DPPH•). Os valores de IC₅₀ são mostrados na Tabela 24.

TABELA 24: Valores de IC₅₀

<i>Corrida</i>	CFT (mg RE/100g PBD)	IC ₅₀
<i>Soxhlet</i>	222,63	80,0 mg/mL
<i>15</i>	27,57	17,4 mg/mL
<i>27</i>	19,24	56,1 mg/mL

Os valores de IC₅₀ indicam a quantidade necessária de extrato para varrer 50% do radical DPPH•, ou seja, quanto mais elevado é o valor de IC₅₀, mais pobre é a atividade antioxidante dos extratos. Da posse dos resultados, observa-se que o extrato

que apresentou maior rendimento em compostos fenólicos totais (corrida 15), demonstrou menor valor de IC_{50} , seguido do extrato da corrida 27, que apresentou as melhores condições para a obtenção de flavonóides isolados, e, por fim o extrato obtido em soxhlet. Esta mesma sequência descreve a ordem de atividade antioxidante. Os dois extratos supercríticos testados apresentaram maior atividade antioxidante frente ao extrato obtido em soxhlet. Uma explicação para tal acontecimento é a temperatura utilizada na extração em soxhlet – temperatura de ebulição do etanol (78°C). Nesta temperatura pode ocorrer a oxidação dos compostos, reduzindo a atividade antioxidante, segundo Cossuta et. al. (2008). Esta mesma temperatura não foi usada nas extrações com fluido supercrítico, sendo a máxima utilizada de 60°C. Além disto, o tempo de exposição dos compostos antioxidantes às altas temperaturas foi dez vezes menor para o caso do fluido supercrítico.

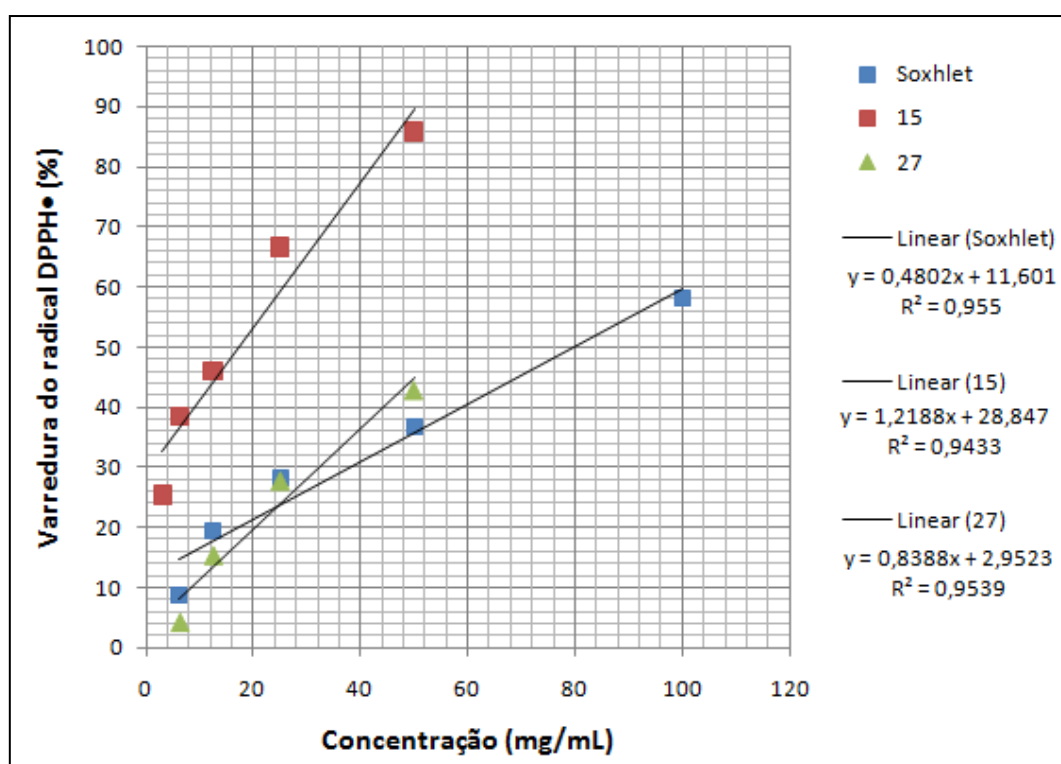


FIGURA 35: Teste da atividade antioxidante

6 Conclusões

A extração de compostos fenólicos de polpa desidratada de butiá com CO₂ supercrítico, usando etanol como cossolvente, foi comparada com o método convencional de extração (soxhlet), mediante a quantificação de compostos isolados (ácido clorogênico, ácido ferúlico, rutina, quercetina e canferol) e de compostos fenólicos totais nos extratos. Os resultados experimentais demonstram que a extração com fluido supercrítico permite a obtenção de compostos fenólicos, porém o método convencional, que utiliza solvente orgânico, resulta em maiores rendimentos sendo, para o caso da rutina, até 20 vezes superior. Já para o ácido clorogênico, o ácido ferúlico, a quercetina e o canferol, os rendimentos obtidos pela extração por soxhlet foram 11, 4, 5 e 3 vezes superiores, respectivamente. Os resultados em compostos fenólicos totais também foram superiores na extração convencional (12 vezes superior).

Na extração com CO₂ supercrítico, com etanol como cossolvente, foram investigadas as variáveis pressão e temperatura do dióxido de carbono e a quantidade de cossolvente (etanol) adicionado como modificador de polaridade. Em diferentes casos, os três parâmetros de extração (pressão, temperatura, e teor de cossolvente) influenciaram significativamente nos rendimentos em compostos fenólicos de butiá, independentemente e interativamente, sendo que o teor de cossolvente foi a variável de maior significância. Ao aumentar o teor de cossolvente observou-se, em todos os casos, um aumento dos rendimentos. Já o aumento da temperatura só ocasionou o aumento dos rendimentos em ácido ferúlico, rutina, canferol e fenólicos totais. O aumento da pressão provocou o aumento dos rendimentos em ácido ferúlico, quercetina e canferol.

A atividade antioxidante dos extratos, obtido por solvente supercrítico e pelo método convencional, foram avaliadas pelo teste IC₅₀. Os resultados revelaram que os extratos supercríticos necessitam de uma menor concentração para varrer 50% do radical DPPH•, quando comparado ao extrato com solvente orgânico. Desta forma atribui-se maior atividade antioxidante aos extratos supercríticos.

Como perspectiva deste trabalho destaca-se a possibilidade da utilização dos recursos naturais nativos do Rio Grande do Sul. O emprego dos frutos de butiá pode ser de forma exploratória sem degradar a natureza, desenvolvendo a economia e a preservação sustentável.

7 Sugestões futuras

Como trabalhos futuros, sugere-se o emprego de polpa de butiá congelada, em substituição à polpa desidratada. Essa sugestão permite avaliar se ocorre a degradação dos compostos fenólicos durante o processo de secagem e armazenamento. Também se sugere analisar os efeitos de mudanças na preparação da matriz de polpa desidratada, como a redução granulométrica.

Tendo em vista que os maiores rendimentos foram obtidos nas condições de maior teor de cossolvente, pode-se elevar o valor máximo estudado de 5%. Vale lembrar, também, que o aumento excessivo do teor de cossolvente implica em alterações das condições críticas da mistura de extração.

Como a soma dos compostos isolados, identificados neste trabalho, não condizem com os compostos fenólicos totais, sugere-se uma análise mais aprofundada da composição da polpa do butiá. Tal tarefa exige a disponibilidade de recursos analíticos mais sofisticados os quais permitam identificar, mais facilmente, os compostos presentes nos extratos.

Para o aperfeiçoamento do equipamento piloto de EFS, sugere-se o emprego de um sistema de reciclo do dióxido de carbono. Este procedimento permite reduzir o consumo do solvente, aumentando a viabilidade econômica do processo.

8 Referências

ADIL, I. H.; ÇETIN, H. I.; YENER, M. E.; BAYINDIRLI, A. Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 55-63, 2007.

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. **Flavonoids**: Chemistry, biochemistry and applications. New York: CRC, 1197 p., 2006.

BIMAKR, M.; RAHMANA, R. A.; TAIP, F. S.; GANJLOO, A.; SALLEH, L. M.; SELAMAT, J.; HAMID, A.; ZAIDUL, I. S. M. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. **Food and Bioproducts Processing**, in press, 2010.

BRUNNER, Gerd. **Gas extraction**: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. Darmstadt: Steinkopff; New York: Springer, 1994.

CARLSON, L. H. C.; BOLZAN, A.; MACHADO, R. A. F. Separation of d-limonene from supercritical CO₂ by means of membranes. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 143-147, 2005.

CARVALHO, José Carlos Tavares; GOSMANN, Grace; SCHENKEL, Eloir Paulo. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: da UFSC/da Universidade, 2001, cap. 20.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; OSSA, E. J. M. de La; ROLDÁN, A. DE ORY, I.; CARO, I.; BLANDINO, A. Extraction of resveratrol from the pomace of *Palomino fino* grapes by supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 304-308, 2010.

CASTRO-VARGAS, H. I.; RODRÍGUEZ-VARELA, L. I.; FERREIRA, S. R. S.; PARADA-ALFONSO, F. Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 319-324, 2010.

CAVERO, S.; GARCÍA-RISCO, M. R.; MARÍN, F. R.; JAIME, Laura; SANTOYO, S.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G.; IBAÑEZ, E. Supercritical fluid extraction of antioxidant

- compounds from oregano Chemical and functional characterization via LC–MS and in vitro assays. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 62-69, 2006.
- CHIU, K.; CHENG, Y.; CHEN, J.; CHANG, C. J.; YANG, P. Supercritical fluids extraction of *Ginkgo* ginkgolides and flavonoids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, p. 77-87, 2002.
- COMIM, S. R. R.; MADELLA, K.; OLIVEIRA, J. V.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction from dried banana peel (*Musa* spp., genomic group aab): extraction yield, mathematical modeling, economical analysis and phase equilibria. **The Journal of Supercritical Fluids**, in press, 2010.
- COSSUTA, D.; SIMÁNDI, B.; VÁGI, E.; HOHMANN, J.; PRECHL, A.; LEMBERKOVICS, É.; KÉRY, Á.; KEVE, T. Supercritical fluid extraction of *Vitex agnus castus* fruit. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 188-194, 2008.
- CRISTEA, D.; BAREAU, I.; VILAREM, G. Identification and quantitative HPLC analysis of the main flavonoids present in weld (*Reseda luteola* L.). **Dyes and Pigments**, v. 57, p. 267-272, 2003.
- CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H.; BATISTA, M. A.. Plantas medicinais e alelopatia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 15, p. 28-34, 2000.
- D.J. GONGOL AND ASSOCIATES, INC. **Diaphragm Pump**. Disponível em <<http://www.gongol.net/>> acessado em jul. 2009.
- DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.
- FARIA, J. P.; ALMEIDA, F.; SILVA, L. C. R.; VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A. Caracterização da polpa do coquinho-azedo (*Butia capitata* var *capitata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 827-829, 2008.
- FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: da UFSC/da Universidade, 2001, cap. 16.
- GELMEZ, N.; KINCAL, N. S.; YENER, M. E. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, p. 217-224, 2009.
- GOULD, K. S.; LISTER, C. Flavonoid functions in plants. In: ANDERSEN, Oyvind M.; MARKHAM, Kenneth R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Flórida: CRC, 2006.
- HENDERSON, Andrew; GALEANO, Gloria; BERNAL, Rodrigo. **Field guide to the palms of the Americas**. Princeton: Princeton University Press, 352p., 1995.

HIDRACAR S.A. **Pulsation Damper**. Disponível em < <http://www.pulsation-dampers-hidracar.com/>> acessado em jul. 2009.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007, 1108 p.

KITZBERGER, C. S. G.; SMÂNIA JR., A.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 631-638, 2007.

KOTNIK, P.; ŠKERGET, M.; ŽELJKO, K. Supercritical fluid extraction of chamomile flower heads: Comparison with conventional extraction, kinetics and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 192-198, 2007.

KREFT, I; FABJAN, N.; YASUMOTO, K. Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. **Food Chemistry**, v. 98, p. 508-512, 2006.

LEUNG, H. W. C.; LIN, C. J.; HOUR, M. J.; YANG, W. H.; WANG, M. Y.; LEE, H. Z. Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, p. 2005-2013, 2007.

LIZA, M. S.; RAHMAN, R. A.; MANDANA, B.; JINAP, S.; RAHMAT, A.; ZAIDUL, I. S. M.; HAMID, A. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid from *Strobilanthes crispus* (Pecah Kaca), **Food and Bioproducts Processing**, 88, 319 (2010).

LORENZI, H. **Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Plantarum, 303p., 1996.

LORENZI, H.; MOREIRA, H. S.; TADEU, J. M. C.; SÉRGIO, L. C. C.; FERREIRA, E. **Palmeiras brasileiras: exóticas e cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 303p., 2004.

LUCIEN, F. P.; FOSTER, N. R. Solubilities of solid mixtures in supercritical carbon dioxide: a review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 17, p. 111-134, 2000.

MACHMUDAHA, S.; KONDO, M.; SASAKI, M.; GOTO, M.; MUNEMASA, J.; YAMAGATA, M. Pressure effect in supercritical CO₂ extraction of plant seeds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, p. 301-307, 2008.

MELO, S. A. B. V.; COSTA, G. M. N.; VIANA, A. C. C.; PESSOA, F. L. P. Solid pure component property effects on modeling upper crossover pressure for supercritical fluid process synthesis: A case study for the separation of Annatto pigments using SC-CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 49, p. 1-8, 2009.

MONTGOMERY, Douglas C. **Design and analysis of experiments**. 5. Ed. New York: John Wiley & Sons, appendix IV, 684 p., 1997.

MUKHOPADHYAY, M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. Florida: CRC, 327 p, 2000.

OHNISHI, M.; MORISHITA, H.; IWAHASHI, H.; TODA, S.; SHIRATAKI, Y.; KIMURA, M.; KIDO, R. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. **Phytochemistry**. v. 36, p. 579-583, 1994.

PENG, J.; FAN, G.; CHAI, Y.; WU, Y. Efficient new method for extraction and isolation of three flavonoids from *Patrinia villosa* Juss. by supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1102, p. 44-50, 2006.

PIANTINO, C. R.; AQUINO, F. W. B.; FOLLEGATTI-ROMERO, L. A.; CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 209-214, 2008.

REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**: Palmeiras. Itajaí, SC: P. Raulino Reitz. 189p. 1974.

ROSSATO, M. **Recursos genéticos de palmeiras do gênero *Butia* do Rio Grande do Sul**. 2007. 136p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul.

ROZEMA, J.; BJÖRN, L. O.; BORNMANN, J. F.; GABERŠČIK, A.; HÄDER, D. P.; TROŠT, T. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems – an experimental and functional analysis of the evolution of UV-B absorbing compounds, **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. v. 66, p. 2–12, 2002.

SAKANASHI, Y.; OYAMA, K.; MATSUIA, H.; OYAMA, T. B.; OYAMA, T. M.; NISHIMURA, Y.; SAKAI, H.; OYAMA, Y. Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca²⁺: A model experiment. **Life Science**. v. 83, p. 164-169, 2008.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: da UFSC/da Universidade, 2001, cap. 16.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 16, p. 144–158, 1965.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. v. 15, p. 71-81, 2002.

TAYLOR, L. T. **Supercritical fluid extraction**: Techniques in analytical chemistry. New York: John Wiley & Sons, INC. 181 p., 1996.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2006.

VERPOORTE, R. Secondary metabolism. In: VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A. W. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**. Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publishers, 2000, 286 p.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 2 ed., 384 p., 1995.

WANG, J.; FANG, F.; HUANG, Z.; WANG, Y.; WONG, C. Kaempferol is an estrogen-related receptor α and γ inverse agonist. **FEBS Letters**. v. 538, p. 643-647, 2009.

WANG, L.; YANG B.; DU X.; YI C. Optimisation of supercritical fluid extraction of flavonoids from *Pueraria lobata*. **Food Chemistry**, v. 108, p. 737-741, 2008.

WILLIAMS, F. B.; SANDER L. C.; WISE, S. A.; GIRARD, J. Development and evaluation of methods for determination of naphthodianthrones and flavonoids in St. John's wort. **Journal of Chromatography A**, v. 1115, p. 93-102, 2006.

YAMAGUCHI, T. T. H.; MATOBA T.C; TERAJO J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 62, p. 1201–1204, 1998.

YORK, P.; KOMPELLA, U. B.; SHEKUNOV, B. Y. **Supercritical Fluid Technology for Drug Product Development**. New York: MARCELD EKKERIN INC, 666 p., 2004.

YU, J.; DANDEKAR, D. V.; TOLEDO, R. T.; SINGH, R. K.; PATIL, B. S. Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1026-1031, 2007.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, v. 109, p. 691-702, 2008.

ZUANAZZI, José Angelo Silveira. Flavonóides. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: da UFSC/da Universidade, cap. 23, 2001.